

B I

[Technical field] The present invention relates to a recombinant DNA molecule (rDNAs) carrying a structural gene that encodes the human tissue factor heavy chain protein (huTFh). More specifically, this invention relates to an expression vector capable of expressing huTFh in host cells containing that vector. The present invention also relates to a synthetic polypeptide analog of huTFh and monoclonal antibodies that bind huTFh and the polypeptide analogs.

13 Page Blank (uspto)

⑫ 公表特許公報 (A)

平1-503438

⑬ 公表 平成1年(1989)11月22日

⑭ Int.Cl.
C 12 N 15/00
A 61 K 39/395
C 07 K 7/06

識別記号
ZNA
ACB

序内整理番号
A-8717-4B
N-8829-4C
Z-8318-4H※

審査請求 未請求
予備審査請求 未請求

部門(区分) 1 (1)
(全 37 頁)

⑮ 発明の名称 ヒトの組織因子に関するDNA断片・ポリペプチド及び抗体

⑯ 特願 昭63-503555
⑯ 出願 昭63(1988)3月29日

⑯ 翻訳文提出日 昭63(1988)11月30日
⑯ 国際出願 PCT/US88/00998

⑯ 国際公開番号 WO88/07543

⑯ 国際公開日 昭63(1988)10月6日

優先権主張 ⑯ 1987年3月31日 ⑯ 米国(US)⑯ 033,047
 ⑯ 発明者 エッジィングトン トマス エス
 ⑯ 出願人 スクリツブス クリニツク アンド リサーチ ファウンデーション
 ⑯ 代理人 弁理士 中村 稔 外8名
 ⑯ 指定国 AT(広域特許), AU, BE(広域特許), CH(広域特許), DE(広域特許), DK, FI, FR(広域特許), GB(広域特許), IT(広域特許), JP, LU(広域特許), NL(広域特許), NO, SE(広域特許)

最終頁に続く

著者(内容に変更なし)

請求の範囲

- (1) ヒトの組織因子遺伝子タンパク質をコードする構造遺伝子を限定する配列を含む、わずか約12,000ヌクレオチド塩基配列を含むDNA断片。
- (2) 上記構造遺伝子が、第1図の約1番から約263番の残基で表わされるアミノ酸残基配列を有するタンパク質をコードする、請求の範囲(1)記載のDNA断片。
- (3) 上記構造遺伝子が、第2図の、約130番から約918番の残基で表わされるヌクレオチド塩基配列を有する、請求の範囲(2)記載のDNA断片。
- (4) 上記構造遺伝子が、第1図の約1番から約219番の残基で表わされるアミノ酸残基配列を有する可溶性ヒト組織因子遺伝子タンパク質をコードする、請求の範囲(1)記載のDNA断片。
- (5) 上記構造遺伝子が、第2図の、約130番から約786番の残基で表わされるヌクレオチド塩基配列を有する、請求の範囲(4)記載のDNA断片。
- (6) 上記第1の配列の5'末端に連続し、かつ上記タンパク質のアミノ末端に結合した、アミノ酸残基リーダー配列をコードする第2の配列も含み、かつは第1及び第2のDNA配列がヒト組織因子遺伝子前駆体タンパク質をコードする混成構造遺伝子を定義する、請求の範囲(1)記載のDNA断片。
- (7) 上記混成構造遺伝子が、第1図の約1番から約263番の残基で表わされるアミノ酸残基配列を有するタンパク質をコードする、請求の範囲(6)記載のDNA断片。
- (8) 上記混成構造遺伝子が、第2図の約34番から約918番の残基で表わされるヌクレオチド塩基配列を有する、請求の範囲(7)記載のDNA断片。

(9) 上記混成構造遺伝子が、第1図の約-32番から約219番の残基で表わされるアミノ酸残基配列を有する、可溶性ヒト組織因子遺伝子タンパク質前駆体をコードする、請求の範囲(6)記載のDNA断片。

(10) 上記混成構造遺伝子が、第2図の約34番から約786番の残基で表わされるヌクレオチド塩基配列を有する、請求の範囲(9)記載のDNA断片。

(11) ヒト組織因子遺伝子タンパク質をコードする構造遺伝子を定義する第1のDNA断片に機能的に結合したベクターを含む組換えDNA分子。

(12) 上記構造遺伝子が、第1図の約1番から約263番の残基で表わされるアミノ酸残基配列を有するタンパク質をコードする、請求の範囲(11)記載の組換えDNA分子。

(13) 上記構造遺伝子が、第2図の約130番から約918番の残基で表わされるヌクレオチド塩基配列を有する、請求の範囲(11)記載の組換えDNA分子。

(14) さらに、上記第1の断片の5'末端に連続し、かつ上記タンパク質に結合した、アミノ酸残基リーダー配列をコードし、かつは第1及び第2のDNA断片が、上記タンパク質の前駆体をコードする混成構造遺伝子を定義する、請求の範囲(11)記載の組換えDNA分子。

(15) 上記混成構造遺伝子が、第1図の約-32番から約263番の残基で表わされるアミノ酸残基配列に対応するアミノ酸残基配列を有する、上記タンパク質の前駆体をコードする、請求の範囲(11)記載の組換えDNA分子。

(16) 上記混成構造遺伝子が、第2図の約34番から約918番の残基で表わされるヌクレオチド塩基配列に対応するヌクレオチ

特表平1-503438(2)

- ア型基配列を有する、請求の範囲(15)記載の組換えDNA分子。
 (17)上記ベクターが上記第1及び第2のDNA断片の復型を指揮する、請求の範囲(11)記載の組換えDNA分子。
 (18)上記ベクターが、宿主細胞中、上記タンパク質を発現しうる、請求の範囲(11)記載の組換えDNA分子。
 (19)上記ベクターが、宿主細胞中、上記前駆体タンパク質を発現しうる、請求の範囲(14)記載の組換えDNA分子。
 (20)上記ベクターが、pKSV-10であり、かつ、上記構成遺伝子が、可溶型の上記前駆体タンパク質をコードし、かつ、第2図の34番から786番の塩基で変わられるスクレオチド配列を有する、請求の範囲(19)記載の組換えDNA分子。
 (21)わずか約50アミノ酸残基を含み、かつ、

-VNDVTVVQIST-
-LYTWNKSSSSGKKT-

からなる群から選ばれた式で表わされる配列に対応するアミノ酸残基を含む、ヒト組織因子結合部位ペプチド類似物。

(22)上記ポリペプチドが、式：

B-VNNDVTVVQIST-OH

で表わされる、請求の範囲(21)記載のポリペプチド。

(23)上記ポリペプチドが、式：

B-LYYWNSSSSGKKT-OH

で表わされる、請求の範囲(21)記載のポリペプチド。

(24)

からなる群から選ばれた式で表わされるヒト組織因子結合部位ポリペプチド類似物。

- (28)上記抗体が、生理学的に許容しうる希釈剤中に存在する、請求の範囲(26)記載の抗体組成物。
 (29)ヒト組織因子重鎖タンパク質及び第1図の26番から49番の残基で示される式で表わされるポリペプチドと免疫反応する抗体分子を產生する、TF8-5G9と命名されたハイブリドーマ。
 (30)請求の範囲(29)記載のハイブリドーマにより產生される抗体分子を含むモノクローナル抗体組成物。
 (31)ヒト組織因子重鎖タンパク質及び、第1図の第26番から第49番の残基で示される式で表わされるポリペプチドと免疫反応する抗体分子を產生する、TF9-10H10と命名された、ハイブリドーマ。
 (32)請求の範囲(31)記載のハイブリドーマにより產生される抗体分子を含むモノクローナル抗体組成物。
 (33)ヒト組織因子重鎖及び、第1図の第146番から第167番で示される式で表わされるポリペプチドと免疫反応する抗体分子を產生する、TF9-6B4と命名した、ハイブリドーマ。
 (34)請求の範囲(33)記載のハイブリドーマにより產生される抗体分子を含むモノクローナル抗体組成物。
 (35)a)身体サンプルを、ヒト組織因子重鎖タンパク質と混合し、免疫反応混合物を作る；
 b)この混合物を、上記抗体がサンプル中に存在するヒト組織因子と免疫反応し、免疫反応産物を形成するのに十分な時間維持する、そして、
 c)ステップb)で生成した免疫反応産物の存在を検定する、以上、a)～c)のステップを含む、体液サンプル中のヒト組織因子重鎖タンパク質の存在を検定する方法。

(25)

からなる群から選ばれた式で表わされるヒト組織因子結合部位ポリペプチド類似物。

- (26)a)ヒト組織因子重鎖タンパク質と免疫反応し、
 b)

からなる群から選ばれた式で表わされるポリペプチドと免疫反応し、かつ

c)第1図の第204番から第226番の部位で示される式で表わされるポリペプチドと実質的に免疫反応しない、抗体分子を含む、抗体組成物。

(27)上記抗体がラベルに結合している、請求の範囲(26)記載の組成物。

(36)a)生理学的に許容しうる希釈剤及び、血栓中に存在するヒト組織因子と効率よく免疫反応する、生体内指示手段と結合した、ハイブリドーマTF9-10H10によって產生される、ある量の抗体分子を含むモノクローナル抗体組成物を被検者に静脈投与する；

b)上記投与を受けた被検者を、上記抗体分子が、血栓の一部として生体内に存在する組織因子と免疫反応し、免疫反応産物を形成するのに十分な、予め決められた時間維持する；そして、

c)ステップb)で生成した免疫反応産物の存在を検定する、以上、a)～c)のステップを含む生体内の血栓を検出する方法。

(37)存在するヒト組織因子と効率よく結合する、TF8-5G9及びTF9-6B4からなる群から選んだハイブリドーマによって產生される、ある量の抗体分子を含有する生理学的に許容される希釈剤を含む、モノクローナル抗体組成物を、被検者に静脈投与することを含む、生体内におけるヒト組織因子の凝血因子V/V₂への結合能を中和する方法。

(38)組成物中、因子V/V₂と効率的に結合する量の、

からなる群から選ばれたポリペプチドを、含有する生理学的に許容された希釈剤を含むポリペプチド組成物を被検者に静脈投与することを含む、生体内におけるヒト組織因子の凝血因子V/V₂への結合を阻害する方法。

(39)a)請求の範囲(22)記載の抗体組成物を含有するパッケージ

特表平1-503438 (3)

を含むサンプル中に存在するヒト組織因子重鎖タンパク質の存在を検定するための、キットの形をした診断システム。

(40) 上記モノクローナル抗体分子を含む上記抗体組成物が、

- a) T F 8 - 5 G 9、
- b) T F 9 - 6 B 4、
- c) T F 9 - 10 H 1 0

からなる群から選ばれたハイブリドーマにより産生される、請求の範囲(39)記載の診断システム。

(41)a)サンプルを、固体マトリックスに固定した、請求の範囲

(15)記載のポリペプチドを含む固体サポートと混合し、結合反応混合物とする。

b) 上記結合反応混合物を、上記凝血因子が上記ポリペプチドと結合し、固相複合体及び上清を形成するに十分な時間保持する。

c) 上記複合体から上記上清を分離する、及び

d) ステップc)の分離した複合体から、上記凝血因子を回収する。

以上、a)～d)のステップを含む、サンプルから血液凝血因子VII/VIIIを早期する方法。

(42) 実質的に、ヒト組織因子重鎖タンパク質を含まない生理活性のあるヒト組織因子重鎖タンパク質の水溶液を含む組成物。

(43) 上記生物学的活性のあるヒト組織因子重鎖タンパク質を、リン脂質中に分散させた、請求の範囲(42)記載の組成物。

(44) 上記溶液が、非イオン性界面活性剤を含む、請求の範囲(42)記載の組成物。

(45) 上記タンパク質が可溶性であり、かつ、第1図の第1番から第219番の部位で表わされるアミノ酸残基配列を有する、請

求の範囲(42)記載の組成物。

(46)a)少なくとも1回の検定を行うのに十分な量の、実質的にヒト組織因子重鎖タンパク質を含まない、生物学的活性のあるヒト組織因子重鎖タンパク質の水溶液を含有する組成物を含むパッケージ、

を含む血管システム液体サンプル中の凝固性を検定するキットの形をした診断システム。

(47) 上記重鎖タンパク質がリン脂質中に分散している、請求の範囲(46)記載の診断システム。

(48) 上記タンパク質が可溶性であり、かつ、第1図の第1番から第219番の部位で表わされるアミノ酸残基配列を有する、請求の範囲(46)記載の診断システム。

(49)a)ヒト組織因子重鎖タンパク質をコードする構造遺伝子を定位する第1のDNA断片及び、第1のDNA断片と連続しており、かつ上記タンパク質に結合する、アミノ酸残基配列をコードする第2のDNA断片で、断片1及び第2のDNA断片合せて上記タンパク質の前駆体をコードする混成構造遺伝子を定位しているDNA断片と機能的に結合する、ホモ型細胞に適合する発現ベクターを含む組換えDNA分子でトランスポンしたキラク細胞の栄養培地での培養を開始する；

b) 上記培養物を上記細胞が上記組換えDNA分子由来のタンパク質を発現し、かつ、上記成熟タンパク質を形成するのに十分な時間、保持する、そして

c) 上記培養物から、上記成熟タンパク質を回収する。

以上、a)～c)のステップを含む、成熟ヒト組織因子重鎖タンパク質の製造方法。

することを含む凝血を阻害する方法。

(58) 上記抗体分子がさらに、ヒト組織因子と免疫反応を起こすことを特徴とする、請求の範囲(57)記載の方法。

(50) 上記混成構造遺伝子が、第2図の第34番から第786番の残基で表わされるヌクレオチド塩基配列を有する、請求の範囲(49)記載の方法。

(51) 請求の範囲(49)記載の方法により產生した、成熟ヒト組織因子重鎖タンパク質を基本的に含む組成物。

(52) 請求の範囲(50)記載の方法により产生した成熟ヒト組織因子重鎖タンパク質を基本的に含む組成物。

(53) ハイブリドーマTF 8 - 5 G 9により产生される抗体分子を、投与時間内に存在するヒト組織因子と効率よく結合できる量を有する、生理学的に許容された希釈剤を含む、モノクローナル抗体組成物を、被検者に静脈投与することを含む、ヒト組織因子の、凝血開始能を中和する方法。

(54) ヒト組織因子重鎖タンパク質及び、第1図の第26番から第49番の残基で示される式で表わされるポリペプチドと免疫反応する抗体分子を產生する、TF 9 - 5 B 7と命名されたハイブリドーマ。

(55) 請求の範囲(54)記載のハイブリドーマにより产生される抗体分子を含むモノクローナル抗体組成物。

(56) ハイブリドーマTF 9 - 5 B 7により产生される抗体分子を含有する生理学的に許容された希釈剤を含む治療に効果的な量のモノクローナル抗体組成物を、被検者に投与することを含む、ヒト組織因子の凝血開始能を中和する方法。

(57)a)ヒト組織因子重鎖タンパク質と免疫反応し、それにより、該タンパク質の因子VII/VIIIへの結合能を阻害し、かつ
b) h u T F h : VII/VIII複合体と免疫反応し、それにより、該複合体の因子X活性化能を阻害する抗体分子を含む治療的に効果的な量の、抗凝血モノクローナル抗体組成物を投与

特許(内容に変更なし)
男 細 著
ヒトの組織因子に関するDNA断片・
ポリペプチド及び抗体

(本出願の関連文献)

本出版は、1987年3月31日に出願された米国出願第033,047号及び1987年6月25日に出願された出願第067,103号の部分継続出願である。

(技術分野)

本発明は、ヒトの組織因子重鎖タンパク質(huTFh)をコードする構造遺伝子を有する組換えDNA分子(rDNA)に関するもので、より詳細には、本発明は、宿主細胞中に含まれる、トロトFhを発現し得る発現ベクターに関するものである。また、本発明はhuTFhの合成ポリペプチド類似物及びトロTFh及び該ポリペプチド類似物と結合するモノクローナル抗体に関するものである。

(発明の背景)

凝血は、一連の凝集因子として知られる細胞性及び血漿性タンパク質によって介される。一連の、酵素、共因子、タンパク質分解及びゲル化反応のカスケードによって起こる。このカスケードの開始は、組織因子(TF)として知られる細胞性レセプターが、凝集因子VII又はその前駆体、因子VIIaと結合し、触媒内活性のある複合体を形成したときに起こる。TFの非存在下、及び複合体への連続する結合がない場合には、VII/VIIaは凝集を開始しない。従って、TFの化学的かつ生物学的特性が、凝集のメカニズムを理解する上で重要なことは明白である。

組織因子は、通常循環器中で可溶化しておらず、また、因子VII/VIIa及び他の凝集因子を含む血漿タンパク質と接觸できないことが分っている、膜に結合した糖タンパク質である。組織因子は

混合物の界面活性剤及びイオン組成に影響されると報告されている。ネマーソン(Nemerson)、ジャーナル・オブ・クリニカル・インベステゲーション(J. Clin. Invest.)47~72頁(1968);ネマーソン(Nemerson)、ジャーナル・オブ・クリニカル・インベステゲーション(J. Clin. Invest.)48~322頁(1969);及びカーソン(Carson)等、サイエンス(Science)、208卷、307頁(1980年)参照。

単離した、もしくは、再加質化したTF含有タンパク質複合物は、我々の手の組織から抽出物によって調製した。組織因子は、天然の組織中に非常に少量しか存在しないので、歴史的に使用されてきた方法は、困難で、時間もかかり、かつ低収率であった。古典的方法のレビューとしては、ネマーソン(Nemerson)等の報告(プログレス・イン・ヘマトシス・アンド・トロンボシス(Prog. Hem. Thromb.)6卷、237~261頁(1982年)を参照せよ。

最近、ブローズ(Broze)等(ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.)260卷、10917~20(1985年))ボム(Bom)等(トロンボ・リサーチ(Tromb. Res.)42卷、635~643頁(1986年)及びグハ(Guba)等(プロシーディング・イン・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci.)USA 83卷、299~302頁(1986年))は、脱脂質化組織因子タンパク質を、非イオン性界面活性剤及びC₁₂C₁₄を含む水溶性溶液に浴かした時、該タンパク質が因子VII/VIIaと結合するという発見に基づいた方法を用いて、ヒトの組織因子(huTF)タンパク質を單離したことを報告している。しかし、組織因子タンパク質を單離する手段として、因子VII/VIIa親和性吸着剤を用いる。これ

特表平1-503438(4)

通常、血管を形成している細胞の表面上には発現されていないが、血管中の单球によるその発現は、バクテリアのリボ多様のような感染性試薬成分、ある抗原により刺激されたTヘルパー細胞から誘導され、直接的にはある刺激されたTヘルパー細胞由来のリンゴ酸キナーゼ及び免疫複合体によって証明することができる。例えばバクテリアのリボ多様同様、インテロイキン1及び腫瘍壞死因子アルファのような单細胞/マクロファージのある炎症仲介物は、血漿の体液側表面にTFを発現する内皮細胞を刺激することができる。典型的に、血管要素におけるTFの発現は、拡大する血管内凝血又は、局所的な凝血の開始、すなわち血栓形成を起こす。

組織因子は、試験管内の繊維芽細胞を含む培養物中のある血管外細胞、未同定型の扁平細胞及び基底膜バリヤーにより、物理する血漿タンパク質から分離されている上皮細胞の表面上に構成的に発現される。これら細胞上のTFの存在は、組織損傷の結果としての血液との接触でクロットを形成する。従って、TFは、凝血システムが開始する要因である。

ハウウェル(Hawell)(アメリカン・ジャーナル・オブ・フィジオロジー(Am. J. Physiol.)31卷1頁(1912年))の報告は、TFを含む单離した組織タンパク質複合物は、リン脂質-タンパク質(リボタンパク質)複合体として存在するときのみ凝集を促進することができることを示す最初の報告である。典型的に、TF含有組織タンパク質の单離が、通常TFタンパク質と会合しているリン脂質を除去してしまうので、单離したタンパク質を再構成化することによるTFの機能的プロコアグラン特活性の再構成が必要であることから、これら再構成の研究が多く研究者によって行なわれてきている。例えば、凝集活性の回復には、リン脂質のタイプ、タンパク質に対するリン脂質の比、及び再構成

方法の使用は、有定量の单離VII/VIIaを入手することの困難性のみならず、因子VII/VIIaの不安定性によっても制限される。

ブローズ等(上記)は、トロTFに特異的なモノクローナル抗体の開発及び免疫親和性吸着剤としてのそれらの使用は、因子VII/VIIa使用の制限によって起こる問題を回避できることを指摘している。しかし、抗トロTFモノクローナル抗体は、該文献中には報告されていない。さらに、子牛のTFによって生じる2つのモノクローナル抗体(カーソン(Carson)等、ブラッド(Blood), 662卷156頁(1985年))は、トロTFとは免疫反応を起こさない(グハ(Guba)等、上記)。

(本発明の概要)

1つの態様において、本発明は、ヒトの組織因子重鎖(huTFh)タンパク質をコードする構造遺伝子を固定する配列を含む、わずか約12,000塩基対を含むDNA断片を考慮している。該構造遺伝子が、第1回の約1番から約253番で示されているアミノ酸残基を有するタンパク質をコードしていることが好ましい。さらに、該構造遺伝子は、第2回の約130番から、約918番で示されるスクレオチド塩基配列を有することが好ましい。

望ましい態様においては、そのDNA断片は、第1の配列の5'末端と連続し、かつ、トロTFトタンパク質のアミノ末端に結合したアミノ酸残基リーダー配列をコードする第2の配列をも含む。その第1及び第2のDNA配列は一緒にになって、ヒトの組織因子重鎖前抗体(ブレトロTFh)タンパク質をコードする構成構造遺伝子を定義している。該構成構造遺伝子は第1回の約1~32番から約253番で示されるアミノ酸残基を有するタンパク質をコードしていることが好ましい。さらに、該構成構造遺伝子は、第2回の約34番から約918番のスクレオチド塩基配列を

特表平1-503438(5)

有することが望ましい。

別の筋膜において、本発明は、ヒトの組織因子重鎖タンパク質をコードする1つの構造遺伝子を定義する第1のDNA断片と機能的に結合したベクターを含む組換えDNA分子を考案している。さらに該組換えDNA分子は、第1の断片の5'末端に連続し、上記タンパク質に結合するアミノ酸残基リーダー配列をコードする第2のDNA断片を含むことが好ましい。すなわち、上記の第1及び第2のDNA断片は一緒にになって、上記タンパク質の前駆体をコードする構成構造遺伝子を定義している。

別の筋膜において、本発明は、わずか約50アミノ酸残基を含み、かつ式

-VNQVYTYD-

で表わされる配列に相当するアミノ酸残基配列を含むヒトの組織因子結合部位のポリペプチド類似物を考案している。

さらに好ましくは、本発明はわずか約50アミノ酸残基を含み、かつ、

-VNQVYTYD-

-LYYVKSSSGKKT-

からなる群から選択される式で表わされる配列に相当するアミノ酸残基を含むヒトの組織因子結合部位のポリペプチド類似物を考案している。

さらに本発明の筋膜には、

- a) ヒトの組織因子重鎖タンパク質と免疫反応する、
- b)

また、本発明は、

- a) 生理学的に許容される希釈剤及び効果的な生体内指示手段と結合させたハイブリドーマTF9-10H10によって作られたある量の抗体分子を含むモノクローナル抗体組成物を被検者に静脈注射により投与し、血栓中に存在するヒトの組織因子と免疫反応させる、
- b) 該抗体分子が、血栓の一部として生体内に存在する組織因子と免疫反応し、かつ、免疫反応物質を形成するのに十分な時間、その投与を受けた被検者を維持する、
- c) ステップb) で生成した免疫反応生成物の存在を検定する、以上a) ~ c) のステップを含む、生体内で血栓を検出する方法も考案した。

さらに、本発明は、TF8-5G9及びTF9-6B4からなる群から選択されるハイブリドーマにより生産され、存在するヒトの組織因子と効率よく結合する、ある量の抗体分子を含む生理学的に許容される希釈剤を含有するモノクローナル抗体組成物を、被検者に静脈注射によつて投与することを含む、生体内で、凝集因子VII/VIIaと結合するヒトの組織因子の能力を中和する方法も考案している。

また、本発明は、因子VII/VIIaと反応するのに有効な量の、

からなる群から選ばれポリペプチドを含む生理学的に許容され

からなる群から選択される式で表わされるポリペプチドと免疫反応する、

- c) 実質的に第1回の部位204から部位226で示される式で表わされるポリペプチドとは免疫反応しない、抗体分子を含む抗体組成物である。

また、本発明は、ハイブリドーマTF8-5G9、TF9-10H10、TF9-5B7及びTF9-6B4と、それらハイブリドーマによって生成される抗体分子を含むモノクローナル抗体組成物を考案している。

本発明は、

- a) 体液試料を、ヒトの組織因子重鎖タンパク質と混合し、免疫反応混合物を作る、
- b) その混合物を、抗体が、その試料中に存在するヒトの組織因子と免疫反応し、免疫反応産物を作るのに十分な時間維持する、そして、
- c) ステップb) で生じた免疫反応産物の存在を検出する、以上のステップを含む体液試料中のヒトの組織因子重鎖タンパク質の存在を検定する方法も考案している。

る希釈剤を含有するポリペプチド組成物を、静脈注射で被検者に投与することを含む、生体内で、ヒトの組織因子が、凝集因子V/VIIaに結合することを阻害する方法を考案している。

別の筋膜において、本発明は、本発明の抗体組成物を含有するパッケージを含み、試料中のヒトの組織因子重鎖タンパク質の存在を検定する、キットの形をとった診断システムを考案している。

その抗体組成物は、

- a) TF8-5G9、
- b) TF9-6B4、
- c) TF9-10H10、
- d) TF9-5B7、

からなるハイブリドーマの群から選ばれたハイブリドーマにより生産されるモノクローナル抗体を含むことが望ましい。

また、試料から血液凝集因子V/VIIaを単離する方法も考案された。

この方法は、

- a) 固体マトリックスに固定した、請求項1-5記載のポリペプチドを含む固体サポートと試料を混合することにより結合反応混合物を作る、
- b) 上記結合反応混合物を、上記凝集因子が上記ポリペプチドと結合し、固体複合体及び上清を作るために十分な時間、維持する、
- c) 上記複合体から、上記上清を分離する、そして
- d) ステップc) の分離した複合体から、上記凝集因子を回収する、以上、a) ~ d) のステップを含む。

さらに、実質的に、ヒトの組織因子重鎖タンパク質を含まない、生物学的に活性のあるヒトの組織因子重鎖タンパク質の水溶液を含む組成物を考案した。この生物学的に活性のあるヒトの組織因

特表平1-503438(6)

子重鎖タンパク質は、リン脂質又は、非イオン性界面活性剤中に分散されていることが望ましい。

血管系抗体試料中の吸収能力を検定するため、キットの形をとった診断システムも考案された。それは、実質的にヒトの組織因子重鎖タンパク質を含まない、少なくとも1回の検定を行いうに十分な量の、生物学的に活性のある、ヒトの組織因子重鎖タンパク質の水溶液組成物を含有するパッケージを含む。その重鎖タンパク質は、リン脂質中に分散していることが望ましい。

別の態様において、成熟したヒトの組織因子重鎖タンパク質の調製法及びその方法によるタンパク質発現産物も考案されている。この方法は、

- a) 発芽培地中、ヒトの組織因子重鎖タンパク質をコードする構造遺伝子を定位する第1のDNA断片及びその第1の断片に連続し、かつ、上記タンパク質に付随するアミノ酸残基リーダー配列をコードする第2のDNA断片と機能的に結合し、宿主ホ乱細胞と適合する発現ベクターで、上記第1及び第2のDNA断片が上記タンパク質の前駆体型をコードする混成構造遺伝子を定位するものであるようなベクターを含む組換えDNA分子でトランスホームした宿主ホ乱細胞の培養を開始する。
- b) その培養物を、上記細胞が、上記組換えDNA分子からタンパク質を発現し、かつ、上記成熟型のタンパク質を形成するのに十分な時間維持する、そして、
- c) 上記培養物から、上記成熟型のタンパク質を回収する、以上a)～c)のステップを含む。

図式の簡単な説明

図式は本公司の一部を形成している。

第1図は、1文字アミノ酸残基コードを用い、左から右に、ア

ミノ末端からカルボキシ末端の方向で、ヒトの組織因子重鎖タンパク質の成熟型及び前駆体（名々、 huTF 及び prehuTF ）の完全なアミノ酸残基配列を示している。主な天然の成熟型タンパク質のアミノ酸残基配列は、1番から263番に対応する。マイナーな成熟型タンパク質の配列は、3番のアミノ酸残基から始まり、263番の残基で終わる。成熟プロセスで除去されるリーダー配列（前駆体領域）に相当するアミノ酸残基配列は、マイナス番号で示した。細胞外ドメイン及びトランスマンプレン・アンカーフィールドは各々、部位1～219及び220～242に対応する。

第2図は、1文字スクレオチド塩基コードを用い、左から右に5'末端から3'末端の方向で、 prehuTF 及び huTF のタンパク質をコードする、cDNAのスクレオチド配列を示している。 huTF の構造遺伝子は塩基130から始まり、塩基918で終まる。

その読み替字は、各アミノ酸を示す1文字を、対応するコドンの中央の塩基上に置くやり方で、スクレオチド配列の上に推算されるアミノ酸残基を付置することにより示した。

第3図は、例2で説明されている、 huTF の凝血活性を測定するのに用いる、凝集検定を示す図である。両対数プロットは、秒とミリリットルあたりのビコグラムで表わしたヒトの組織因子（ huTF ）濃度で示される、ヒトのクエン酸化血液凝集（凝血）時間を示したものである。

第4図は、1.5%ポリアクリルアミドゲル中で電気泳動した、因子VII/VIIIの親和性で単離した huTF のオートフルオログラムを示している。 huTF の単離、 ^{125}I によるラベル化及び電気泳動は、例4と同様に行った。レーンAは、DTTによる還元後の単離した huTF を示している。レーンBは、DTT還元なしで、電気泳動した同サンプルを示している。上のバンド及び下のバンド（U及びLと表示した）は、各々、約5.8及び47kの大きさの huTF に対応している。オートフルオログラフィー後、上のバンド及び下のバンドを切り出し、DTTを含むSDSサンプルバッファ中で再水和し、第2の1.5%アクリルアミドゲルのサンプルウェルに入れ、電気泳動した。レーンCは、レーンBから得られた、下のバンドの再電気泳動の結果を示している。レーンDは、レーンBから得られた上のバンドの再電気泳動の結果を示している。1.25及び4.7キログルトン（k）の見かけ上の分子量をもつタンパク質が矢印で示されている。

第5図は、 ^{125}I によるラベル化 huTF を示した見かけの分子量をもつ分子量標準物質を示している。

第5図は、1.5%ポリアクリルアミドゲル中で電気泳動した、因子VII/VIIIの親和性で単離した huTF のオートフルオログラムを示している。 huTF の単離、 ^{125}I によるラベル化及び電気泳動は、例4と同様に行なった。レーンAは、DTTによる還元後の単離した huTF を示している。レーンBは、DTT還元なしで、電気泳動した同サンプルを示している。上のバンド及び下のバンド（U及びLと表示した）は、各々、約5.8及び47kの大きさの huTF に対応している。オートフルオログラフィー後、上のバンド及び下のバンドを切り出し、DTTを含むSDSサンプルバッファ中で再水和し、第2の1.5%アクリルアミドゲルのサンプルウェルに入れ、電気泳動した。レーンCは、レーンBから得られた、下のバンドの再電気泳動の結果を示している。レーンDは、レーンBから得られた上のバンドの再電気泳動の結果を示している。1.25及び4.7キログルトン（k）の見かけ上の分子量をもつタンパク質が矢印で示されている。

第6図は、例4で説明されているように、まず huTF 特異的モノクローナル抗体で免疫沈降化し、ついで8～17%のポリアクリルアミド勾配ゲルで電気泳動した、因子VII/VIIIの親和性で単離した huTF のオートフルオログラムを示している。レーンAは、DTTによる還元を伴う、電気泳動した ^{125}I ラベル化 huTF を示している。レーンBは、還元なしで電気泳動した同サンプルを示している。

第7図は、1.5%アクリルアミドゲル中で電気泳動した、因子VII/VIIIの親和性で単離した huTF のオートフルオログラムを示している。単離、 ^{125}I によるラベル化、還元及び脱グリコシ

ル化は、例4で説明されているように行なった。レーン1は、キログルトンで表わされた見かけ上の分子量をもつ標準物質として電気泳動したタンパク質標準物質：リゾチーム、1.43；カルボニック・アンヒドライゼ、3.0.0；オバルブミン、4.6.0；ウシ血清アルブミン、6.9.0；ホスホリーゼ、9.2.5；ミオシン、20.0.0（すべて1L州、アーリントンハイツ・マーシャム社より入手）を示している。 ^{125}I - huTF を含むサンプルをDTT存在下（レーン2及び3）又は非存在下（レーン4及び5）で電気泳動した。これら ^{125}I - huTF 含有サンプルのいくつかは電気泳動前に脱グリコシル化し（レーン3及び5）、他のものは脱グリコシル化しなかった（レーン2及び4）。

レーン3及び5に流した ^{125}I - huTF 含有サンプルは、電気泳動前に脱グリコシル化され、レーン2及び4のものは脱グリコシル化しなかった。

第8図は、例9で説明されているように、1.0%のポリアクリルアミドゲル中で電気泳動した、免疫親和性で単離された huTF のオートフルオログラムを示している。レーン1は、キログルトンで表わされた見かけの分子量をもつ、マークとして電気泳動した標準タンパク質：テトクロムC、1.2.4；ラクトグロブリン、1.8.4；カルボニック・アンヒドライゼ、2.9.0；ラクテート・デヒドロゲナーゼ、3.6.0；オバルブミン、4.3.0；グルタメト・デヒドロゲナーゼ、5.5.0；及びホスホリーゼ、9.5.5（全て、MA州ニュートンセンターのディバーシティ・バイオテク（Diversified Biotech.）から入手した）を含んでいる。

レーン2は、スミス（Smith）等のBCAタンパク質検定法（アカリティカル・バイオケミストリー（Azal. biotech.））150型、7.6～8.5頁（1985年））を用いて測定し、かつDTT

特表平1-503438(7)

を用いて還元した約2.0μgのタンパク質を含んでいる。h u T F 番号(h u T F h)は、明らかに、およそ4.7Mrの位置に確認され、h u T F 番号は、およそ1.25Mrの位置にわずかに確認された。タンパク質は、レムリ(Lemli)(ネイチャー(Nature), 227巻、680~685頁(1970))の報告に従がい、コマージ・ブルー染色により可視化した。

第9図は、h u T F hの非リン脂質化(非脂質化)ポリペプチド類似物による、h u T F 由来の凝集開始阻害の投与-応答曲線を示すグラフである。種々の濃度の非脂質化ポリペプチドによる凝集阻害率は、例12に説明されているように測定した。テストしたポリペプチドは、p 26-49(△TF2649)、p 121-155(○、TF121、155)、p 146-167(●、TF146、167)及びp 204-226(■、TF204、226)である。

第10図は、h u T F hのリン脂質化した(脂質化した)ポリペプチド類似物による、h u T F 由来の凝集開始阻害に関する投与-応答曲線を示すグラフである。その阻害率は例9で説明されているように、両方法により、同類似物に対して測定した。

第11図は、組換えDNAプラスミドpCTF64、pCTF314及びpCTF403内のEcoR I断片挿入物の制限地図を示したものである。その挿入物(——)は、プレトロTFト遺伝子の完全なヌクレオチド配列に対応する重複するヌクレオチド配列領域を示している。別に、その挿入物は、第2図で示されている、残基1~486(pCTF64に含まれている)、残基135~775(pCTF314に含まれている)、及び残基776~1125(pCTF403に含まれている)由来のヌクレオチドに対応するヌクレオチド配列を、左から右に5'から

例19に述べられているように測定した。白丸(○)はTF8-5G9抗体を示し、黒丸(●)は無関係の抗体を示している。

第16図は、抗TFモノクローナル抗体TF8-5G9による精製したヒトの脳TPの凝集活性の阻害を示している。リン脂質ベシクル中に再構成された、精製したヒトの脳TFの凝集活性は、種々の濃度の精製IgGと、37℃30分間、前処理した後測定した。丸は、抗TP抗体TF8-5G9に対するもので、三角は、無関係なコントロール抗体PAb100に対するものである。データは、抗体を加えない場合の活性に対する阻害率として表わされている。

第17図は、精製した抗TFモノクローナル抗体で処理した、培養されたJ82膀胱がん細胞に対する阻害因子Xの結合及び、その細胞による因子Xの形成を示している。因子Xの形成率の阻害の値は、三角で表わされ、因子Xの結合阻害の値は、丸で表わされている。データは、抗体を加えないでインキュベートした細胞を用いて得られる値に対する阻害率で表現されている。パネルAは抗体TF8-2C4の効果、パネルBは、抗体TF9-5B7の効果を示している。

第18図は、例25で述べられているような、免疫活性で準備したh u T F のウェスタンプロット分析を示している。1.5%ポリアクリルアミドゲルに次に示すものがかけられた。レーン1は、キロダルトン(k)でパネルAの左に示された見かけの分子量をもつ分子量標が含まれる。レーン2は、電気泳動前に還元された、精製ヒトヘモグロビン1μgを含んでいる。レーン3は、準備したh u T F を電気泳動前に還元したもの0.5μgを含んでいる。レーン4は、非還元の、準備されたh u T F 0.5μgを含んでいる。SDS-PAGE後、生じたタンパク質バンドを青

3'の方角で含んでいる。また、例16で述べられている種々の組換えDNA分子を構築するのに用いられた挿入物内の制限酵素切削部位のおよその位置も示されている。さらに、完全な形で示されるリーダーベブチド(■)及びランスマップレン・アンカードメイン(▲)をもつプレトロTFトタンパク質のおよその位置も示してある。

第12図は、h u T F hの非リン脂質化(非脂質化)ポリペプチド類似物による、h u T F 由来の凝集開始の阻害を示す、投与-応答曲線のグラフである。モル濃度で表わした種々の濃度の非脂質化ポリペプチドによる凝集の阻害率(%)は、例12に述べられているように測定した。試験したポリペプチドは、p 26-35(△)、p 26-49(○)、p 152-159(□)及びペプチドp 40-71、p 72-104、p 94-123及びp 161-189であるがこれらは全て、実質的な阻害を示さず、無的に風丸(●)で示した。

第13図は、TF8-5G9抗体組成物による凝集阻害の速度論を示すグラフである。凝集の阻害率(%)は、例18で述べられているように測定された種々の抗体免疫反応時間にわたってプロットしてある。

第14図は、h u T F 由来の凝集の抗トロTF抗体による阻害の投与-応答を示すグラフである。種々の濃度の抗トロTFモノクローナル抗体TF8-5G9による凝集の阻害率(%)は例19に述べられているように測定した。

第15図は、h u T F 派がヒトの胎盤芽細胞系GM1381の細胞破壊物である、h u T F 由来の凝集の、抗トロTF抗体による阻害の投与-応答のグラフである。種々の濃度の抗トロTFモノクローナル抗体TF8-5G9による凝集の阻害率(%)は、

泳動的にニトロセルロースに移した。このようにして作ったウエスタン・プロットを0.2μg/mの親和性指標したウサギ抗h u T F IgG(パネルA)、1μg/mのウサギ抗ヘモグロビンIgG(パネルB)又は、1μg/mの非免疫ウサギIgG(パネルC)と免疫反応させた。免疫染色したバンドの見かけの分子量を右にKD表示して示した。

発明の詳細な説明

A. 定義

アミノ酸：ここで用いられる全てのアミノ酸は、天然のL-型のものである。慣用的ポリペプチド命名法に従がい(ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.)、243巻、3557~59頁(1969))、アミノ酸残基の略号は、次の表に示されているとおりである。

対応表			
記号	アミノ酸	記号	アミノ酸
L	Leu	T	Thr
Y	Tyr	C	Cys
G	Gly	F	Phe
M	Met	A	Ala
S	Ser	L	Ile
V	Val	D	Asp
P	Pro	R	Lys
		H	His
		K	Arg

特表平1-503438(8)

K	Lys	リジン
H	His	グルタミン
G	Gln	グルタミン
I	Gly	グルタミン酸
W	Trp	トリプトファン
R	Arg	アルギニン
D	Asp	アスパラギン酸
N	Asn	アスパラギン
C	Cys	シスチイン

ここでは、全てのアミノ酸配列は、従来どおり左から右に、アミノ酸末端からカルボキシ末端への方向で示されていることに注意を要する。さらに、アミノ酸残基配列の始め又は終りのダッシュは、各々、アミノ及びカルボキシ末端のH及びOH(水素及び水酸基)のようなラジカルへの結合、もしくは、ポリペプチド鎖における1から約15残基の1つ以上のアミノ酸残基配列を示している。

ポリペプチド及びペプチド：ポリペプチド及びペプチドはここでは、結合する残基のアルファアミノ基とカルボキシル基の間のペプチド結合により互いに直線的に結合した、わずか約50アミノ酸残基を意味するものとして互換的に用いられている。

タンパク質：タンパク質は、ポリペプチドのように互いに直線的に結合した50以上のアミノ酸残基を意味して用いられている。

スクレオチド：糖部分(ペントース)、リン酸及び塩基ヘテロ環塩基からなるDNA又はRNAの单量体ユニット。この基盤はグリコシド炭素(ペントースの1'炭素)を介して糖部分と結合しており、塩基と糖の組合せはスクレオシドと呼ばれる。スクレオシドがペントースの3'又は5'部位に結合するリン酸基を含

むとき、それをスクレオチドと呼ぶ。

塩基対(bp)：二本鎖DNA分子内のアデニン(A)とチミン(T)又はシトシン(C)とグアニン(G)の組合せ。

B. DNA断片

生物において、タンパク質又はポリペプチドのアミノ酸配列は遺伝子コードを介して、そのタンパク質をコードする構造遺伝子のデオキシリボ核酸(DNA)配列に直接関係づけられる。従って、構造遺伝子は、それがコードするタンパク質又はポリペプチドのアミノ酸残基配列で定義することも可能である。

重要でかつよく知られた遺伝子コードの性質にリダンダシシーがある。すなわち、タンパク質を作るのに用いられるほとんどのアミノ酸に対し、1つ以上のコードするスクレオチド・トリプレット(コドン)が、1つのアミノ酸残基をコード又は指定している。それ故、1つのアミノ酸残基配列をコードするのに多くの異なるスクレオチド配列が存在することになる。そのようなスクレオチド配列は、全ての生物において、同じアミノ酸残基配列を生産することが可能なので、機能的には等価であると考えられている。場合によっては、プリン又はピリミジンのメチル化物がスクレオチド配列の中に組込まれている事もある。しかし、そのようなメチル化は、コード関係にはなんら影響しない。

本発明のDNA断片は、ヒトの組織因子重複タンパク質(huTF)をコードするDNA配列を含むという特徴をもつ。好ましい結果において、このDNA断片は、ヒトの組織因子重複タンパク質(ブレクトuTF h)をコードするDNA配列を含んでいる。すなわち、本発明のDNA断片は、huTF h、また、より好むのは、ブレクトuTF hの構造遺伝子の存在で特徴づけられる。さらに、可溶性のhuTF h又は可溶性のブレクトuTF hタン

パク質をコードする構造遺伝子を形成するDNA配列がDNA断片中に含まれることが望ましい。その遺伝子はhuTF h又はブレクトuTF hタンパク質中にあるアミノ酸残基をコードする各コドンが中断することなく連続して存在する、すなわち、インtronを含まない遺伝子であることが望ましい。

従って、第2図に示される、5'末端の約130番から、3'末端の約918番の部位の配列を基本的に含み、かつ、huTF hを発現することができるDNA断片が本発明の1版様を構成している。第2図に示される、約34番から約918番の部位の配列を基本的に含み、かつ、ブレクトuTF hを発現できるDNA断片が、本発明のもう1つの版様を構成している。

好ましい、可溶性のhuTF h分子は、uTF hをコードするDNAの5'末端の約150残基によってコードされるアミノ酸残基を欠いている。従って、第2図で示される、5'末端の約130番から約756番を経由して、3'末端の約801番の部位までの配列を基本的に含み、かつ、可溶性のhuTF hを発現できるDNA断片は、本発明のさらに好ましい版様を構成する。可溶性のhuTF h構造遺伝子を形成する、典型的な好ましいDNA断片は、第2図で示されている、約130番から約756番約130番から約771番、約130番から約786番、及び約130番から約801番で表わされるスクレオチド配列を有するものである。

可溶性ブレクトuTF hをコードする、好ましいDNA断片は、それらが、第1図で示されるように、-32番から0番までのアミノ酸残基で示されるよう、アミノ末端リーダー配列を含むタンパク質をコードしていること以外は、可溶性huTF hをコードしているものと同じである。従って、可溶性ブレクトuTF h

をコードする構造遺伝子を形成している、好ましいDNA断片は、基本的に、第2図で示されている5'末端の約34番から756番を経由して、3'末端の約801番で示される配列を含んでいる。典型的な好ましい可溶性のブレクトuTF hコードのDNA断片とは、第2図で示されているところの、約34番から約756番、約34番から約771番、約34番から約786番及び約34番から約801番のスクレオチド残基配列を有するものである。

可溶型も含めて、上記huTF h及びブレクトuTF hタンパク質をコードする相同的DNA及びRNAも先に開拓したように考観された。

huTF h及びブレクトuTF hをコードするDNA断片は化学的技術、例えばマテウシ(Matessci)等のホスホトリエステル法(ジャーナル・オブ・アメリカン・ケミカル・ソサイアティー(J. Am. Chem. Soc.) 103巻3185頁(1981年))により容易に合成できる。(ここで引用されている技術の公開は参考として組込まれている。)もちろん、コード配列を化学的に合成することにより本来のアミノ酸残基配列をコードする代りに過当な埋めを用いることにより、いかなる修正も望みどおりにすることができる。しかし第2図に示されているものと全く相同的な配列を含むDNA分子の方が望ましい。

さらに、基本的にhuTF h及びブレクトuTF hタンパク質をコードする構造遺伝子を含むDNA断片に、これらの遺伝子を含む組換えDNA分子から得ることができる。例えば、プラスミドタイプの組換えDNA分子pCTF64、pCTF314及びpCTF403はいずれもhuTF h及びブレクトuTF hタンパク質の異なる領域をコードするDNA配列を含んでおり、また、これらを

合せると、各タンパク質を発現するのに必要な全てのDNA配列を有することになる。各々、 λ CTF64、 λ CTF314又は λ CTF403でトランスポームした大腸菌の培養物は、1987年3月27日、ブダペスト協定に基づき、MD州、ロックビル、パークローン、ドライブ12301番、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(ATCC)に保管され、各々、受理番号67370、67368及び67369が割当てられた。

λ uTF λ 又はブレ λ uTF λ をコードするDNA配列を含むDNA断片は、よく知られている方法を用い、先に述べた各プラスミドからの適当な制限断片を機能的に結合することにより作ることができる。典型的に、本方法で作られた本発明のDNA分子は、粘着末端、すなわちこの分子の二本鎖領域を越えて伸びた“突き出した”一本鎖領域をもっている。本発明のDNA分子上に粘着末端があることは望ましいことである。

本発明は、上述のDNA断片と等価なりRNAも考案している。

C. 組換えDNA分子

本発明の組換えDNA分子は、本発明のDNA断片をベクターに機能的に結合することにより作ることができる。

ここで用いられているように、“ベクター”という言葉は、細胞中で自己複製できるDNA分子で、別のDNA断片を機能的に結合することができ、その結合した断片の複製をもたらすものを意味する。 λ uTF λ 及びブレ λ uTF λ 遺伝子の発現を司ることができるべきベクターは、ここでは“発現ベクター”と呼ばれる。従って、組換えDNA分子(rDNA)とは、天然においては通常一緒にいることはない少なくとも2つのスクレオチド配列を含むハイブリッドDNA分子のことである。

バイオラド・ラボラトリーズ社)及び λ PL、 λ KK223(NJ州、ビスカタウェイ、ファルマシア社)がある。

真核細胞、好ましくは脊椎生物細胞と適合する発現ベクターも、本発明の組換えDNA分子を作るのに用いられる。真核細胞発現ベクターもこの分野でよく知られており、数社から市販されている。典型的にはこれらのベクターは、目的とするDNA断片の挿入に便利な制限部位を含んでいる。これらのベクターの典型的なものには、 λ SUL及び λ KSV-10(ファルマシア社)、 λ BPV-1/ λ ML24(インターナショナルバイオテクノロジー社)及び λ TDT1(ATCC, #31255)がある。

好ましい結果において、本発明の組換えDNA分子を構築するのに用いられる真核細胞発現ベクターは、真核細胞中で効果的な選択マーカー、好ましくは、薬剤耐性マーカーを含んでいる。好ましい薬剤耐性マーカーとは発現によりネオマイシン耐性となる遺伝子、すなわち、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ(neo)遺伝子である。サウザーン(Southern)等、ジャーナル・オブ・モレキュラー・アンド・アプライド・ジェネティクス(J. Mol. Appl. Genet.)1巻、327~341頁(1982年)。

本発明のrDNAを作るための、レトロウイルス発現ベクターの使用も考案されている。ここで用いられているように、“レトロウイルス発現ベクター”とは、レトロウイルスゲノムのロング・ターミナル・リピート(LTR)領域由来のプロモーター配列を含むDNA分子を意味する。

好ましい結果において、典型的な発現ベクターは、真核細胞中では複製不能なレトロウイルス発現ベクターである。レトロウイルスの構造と使用法は、ソージ(Soria)等により報告されてい

本発明のDNA断片を機能的に結合させるベクターの選択は、この分野でよく知られているように、例えば、タンパク質の発現などの機能的性質及びトランスポームされる宿主細胞などが組換えDNA分子の構造技術の上で本質的な制限となることから、これらに直接依存する。しかし、本発明によって考案されたベクターは、これに機能的に結合しているDNA断片中に含まれる λ uTF λ 又はブレ λ uTF λ 遺伝子の、少なくとも複製を、好ましくは発現をも可能にする。

好ましい結果において、本発明により考案されたベクターは、原核性のレブリコン、すなわち、バクテリア宿主細胞のような原核細胞中の、これをトランスポームした染色体外組換えDNA分子の自己複製及び維持を可能とするDNA配列を含んでいる。このようなレブリコンは、この分野ではよく知られている。さらに、原核性レブリコンを含むこれら細胞は、これをトランスポームしたバクテリア宿主に薬剤耐性を与える遺伝子も含んでいる。典型的なバクテリアの薬剤耐性遺伝子は、アンビシリソ又はテトラサイクリンに対する耐性を与えるものである。

原核性レブリコンを含む、これらのベクターは、これをトランスポームした大腸菌のようなバクテリア宿主細胞中で、 λ uTF λ 又はブレ λ uTF λ 遺伝子を発現(転写及び翻訳)させることができる原核性プロモーターも含んでいる。プロモーターとは、RNAポリメラーゼの結合を許し、転写を開始させる、DNA配列でできた発現コントロール要素である。バクテリア宿主と適合するプロモーター配列の典型的なものは、本発明のDNA断片の挿入に便利な制限部位を含むプラスミドベクター中に存在する。このようなベクタープラスミドの典型的なものには、 λ UCB、 λ UC9、 λ BR322、 λ BR329(CA州、リッチャモンド、

バイオラド・ラボラトリーズ社)及び λ PL、 λ KK223(NJ州、ビスカタウェイ、ファルマシア社)がある。

相補的なホモポリマー末端を介して、DNAをベクターに機能的に結合する多くの方法が開発されてきている。例えば、相補的なホモポリマーを、挿入するDNA断片及びベクター-DNAに附加することができる。それから、このベクターとDNA断片を相補的ホモポリマー末端間の水素結合で結合し、組換えDNA分子を作る。

1つ以上の制限部位を含む合成リンクーは、DNA断片をベクターに結合するもう1つの方法を提供する。先に報告されているように、エンドヌクレアーゼで制限消化することによって生成したDNA断片を、3'-5'エンドヌクレアーゼ活性で突出する3'、一本鎖末端を除き、また残存活性で、くばんだ3'末端を充満する酵素、バクテリオファージT4DNAポリメラーゼ又は、大腸菌DNAポリメラーゼIで処理する。従って、これらの活性の組合せて、平滑末端DNA断片が生ずる。それから、この平滑末端断片を、バクテリオファージT4DNAリガーゼのような、平滑末端DNA分子のライゲーションを触媒することができる酵素の存在下、大過剰のリンクー分子とインキュベーションする。このような反応でその末端にポリリンクーをもつDNA断片ができる。さらにこのDNA断片を適当な制限酵素で切断し、このDNA断片と適合する末端を作る酵素で切断した発現ベクターとライゲーションする。

多様の制限エンドヌクレアーゼ部位を含む合成リンクーは、CN州ニュー・ヘブン、インターナショナル・バイオ・テクノロジー社を含む多くの会社から市販されている。

本発明は、上述の組換えDNA分子と等価なRNAも考案して

特表平1-503438(10)

年)、グラハム(Graham)等、ウイロロジー(Virology)、52巻、456頁(1973年);及びウィグラー(Wigler)等、プロジェクト・ディンギー・イン・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci.) USA、76巻、1373~1376頁(1979年)を参照せよ。

うまくトランスキームされた細胞、すなわち、本発明の組換えDNA分子を含む細胞は、従来の方法によって同定することができる。例えば、本発明のrDNAの導入から生じた細胞をクローニング化し、モノクローナルコロニーを作る。これらのコロニーから細胞を収穫し、溶解し、そのDNA内容物について、サウザーン(Southern)(ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(J. Mol. Biol.)、98巻、509頁(1975年)又は、ペレント(Barent)等(バイオテクノロジー(BioTech.)3巻、208頁(1985年)によって報告されている方法を用いて、そのrDNAの存在を調べた。

rDNA存在の直接的検定に加え、成功したトランスキームは、そのrDNAがh_uTF_h又はブレト_uTF_hを発現することができるときは、従来の免疫学的方法で確かめることができる。例えば、発現ベクターでうまくトランスキームできた細胞は、h_uTF_h又はブレト_uTF_h抗原性を示すタンパク質を生産する。トランスキームさせた細胞試料を収穫し、本発明のハイブリドーマによって生産される抗体原と特異的な抗体を用い、h_uTF_h又はブレト_uTF_hを検定する。

このように、トランスキームした宿主細胞それ自体に加え、本発明は、栄養培地中のそれらの細胞の培養物好ましくは、モノクローナル(クローニング的に均一な)培養物、又は、モノクローナル培養物由來の培養物も考慮した。この培養物は、h_uTF_h又は

いる。

D. トランスキームした細胞と培養

本発明は、本発明の組換えDNA分子、好ましくは可溶性のh_uTF_h又はブレト_uTF_hを発現できるrDNAでトランスキームした宿主細胞にも関連している。この宿主細胞は、原核性でも真核性でもよい。バグテリア細胞は、原核宿主細胞であることが好ましく、また典型的には、ND州ベセスダ、ベセスダ・リサーチラボラトリース社から入手できる大腸菌DH5⁺株のような、大腸菌の株である。好ましい真核性宿主細胞には、イースト及び本乳頭細胞、好ましくはマウス、ラット、サル又はヒトの線維芽細胞系列のような脊椎動物細胞が含まれる。好ましい真核性宿主細胞には、CCL61としてATCCから入手できるチャイニーズ・ハムスターの卵巣(CHO)細胞及びCRL1658としてATCCから入手できるNIHスイスマウス胚細胞がある。

本発明の組換えDNAによる適当な細胞宿主のトランスキームーションは、典型的には用いるベクターのタイプに応じて、よく知られている方法により行なわれる。例えば、原核性宿主細胞のトランスキームーションに関しては、コーエン(Cohen)等のプロジェクト・ディンギー・イン・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci.) USA、69巻、2110頁(1972年);及びマニアチス(Maniatis)等のNY州コールド・スプリング・ハーバー・コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリ、ラボラトリ、マニュアル、モレキュラー・クローニングを参照せよ。脊椎動物細胞のrDNAを含むレトロウイルス・ベクターによるトランスキームーションに関しては、例えば、ソージ(Sorge)等、モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー(Mol. Cell. Biol.)4巻、1730~1737頁(1984

ブレト_uTF_h抗原性を示すタンパク質、またさらに好ましくは、生物学的に活性かh_uTF_hを含むことが望ましい。

トランスキームした宿主細胞を培養するのに有用な効率培地は当分野ではよく知られており、また、いくつかの販売会社より市販されている。宿主細胞が本乳頭細胞であるような様においては、「無血清」培地を使うことが望ましい。

B. h_uTF_h及びブレト_uTF_hタンパク質の生産方法

本発明の別の特徴には、h_uTF_h抗原性を示すタンパク質の生産方法がある。h_uTF_h抗原性を示すタンパク質は天然の組換え因子によって説明される抗体を免疫反応を起こすタンパク質である。h_uTF_h抗原性を示すタンパク質は、抗原として有用であり、又、抗体を生じさせるときにも有用で、その各々が本発明の診断システムや診断法で使用することができる。

本方法は、h_uTF_h又はブレト_uTF_h、好ましくは可溶性のh_uTF_h又は可溶性のブレト_uTF_hを発現することができる。本発明の組換えDNA分子でトランスキームした宿主細胞、好ましくは、ヒトの細胞を含有する栄養培地を含む培養の開始する。この培養を、そのトランスキームした細胞がh_uTF_h又はブレト_uTF_hタンパク質を発現するのに十分な時間維持する。発現したタンパク質をその培地から回収する。好ましい結果において、本発明の方法によって作られたh_uTF_hタンパク質はさらにh_uTF_hの生物学的活性すなわち、因子V/H_uと結合する能力を示す。これらの方法は、宿主細胞においてブレト_uTF_h遺伝子を発現できる組換えDNA分子でトランスキームした本乳頭細胞宿主細胞の培養を含んでいる。その培養により、ブレト_uTF_hタンパク質が発現し、つづいて、そのブレト_uTF_hの細胞内の翻訳後の修正が起こり、生物学的に活性のあるh_uTF_hタン

パク質が生じる。

培養物から、発現したタンパク質を回収する方法は、当分野でよく知られたことであり、従来の生化学的方法を用い、その培養物のタンパク質含有百分率の分画が含まれる。例えば、タンパク質の分画に対して知られているゲル電気泳動、ゲルクロマトグラフィー、アフィニティ・クロマトグラフィー及びそれに類するものが、培養物中にある発現タンパク質の単離に用いることができる。さらに、免疫親和性、免疫吸着やそれに類するもののような、免疫化学的方法も、従来法を用いて行なわれる。

F. h_uTF_h及びブレト_uTF_hタンパク質組成物と発現産物

本発明は、また本発明のrDNAのh_uTF_h及びブレト_uTF_hタンパク質発現産物も考慮している。好ましい結果において、h_uTF_h及びブレト_uTF_h発現産物は第1図で示されているように、各々残基1から263及び-32から263に対応するアミノ酸残基を有している。その発現タンパク質は、第1図で示されるブレト_uTF_h及びh_uTF_hのアミノ酸配列の長さの少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%であることが望ましい。

別の結果において、可溶型のh_uTF_h及びブレト_uTF_hと、可溶性h_uTF_hそして、または可溶性ブレト_uTF_hを含む組成物も考慮されている。ここで用いている「可溶性」という言葉は、本来のh_uTF_h及びブレト_uTF_h分子の細胞外ドメイン、すなわち、第1図に示すところのアミノ末端から残基220までの、h_uTF_h及びブレト_uTF_h分子領域を基本的に含むことを特徴とするh_uTF_h及びブレト_uTF_h分子を意味する。それゆえ、可溶性h_uTF_h及び可溶性ブレト_uTF_hは、本来の分子で形成されるトランスマンプレン・アンカー領域の実質的部

分(第1図で示すところの残基220から242)を含まない。ここで用いている“ $\text{h}\text{u}\text{T}\text{F}\text{h}$ ”及び“ $\text{p}\text{l}\text{e}\text{c}\text{h}\text{u}\text{T}\text{F}\text{h}$ ”という言葉は今後特にことわらないかぎり、そのタンパク質の可溶型を含んでいる。

可溶性の $\text{h}\text{u}\text{T}\text{F}\text{h}$ 及び可溶性 $\text{p}\text{l}\text{e}\text{c}\text{h}\text{u}\text{T}\text{F}\text{h}$ には、改変的なトランスメンブレン・アンカー領域を含んでいないので、これらは、生理学的に許容される水溶液中で実質的に凝集することはない。それゆえ、可溶性の $\text{h}\text{u}\text{T}\text{F}\text{h}$ 及び可溶性の $\text{p}\text{l}\text{e}\text{c}\text{h}\text{u}\text{T}\text{F}\text{h}$ は、存在する $\text{h}\text{u}\text{T}\text{F}\text{h}$ 又は $\text{p}\text{l}\text{e}\text{c}\text{h}\text{u}\text{T}\text{F}\text{h}$ タンパク質の少なくとも約70%、好ましくは約80%、そしてより好ましくは約90%（重量ペーセント）が非凝聚（单量体）型であり、タンパク質濃度約0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ から約1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の生理学的に許容された希釈剤を用いた水溶液を作りうることを特徴とする。タンパク質溶液中に存在する凝聚量の測定法は、当分野ではよく知られているところであり、排除カラムクロマトグラフィーによるサイズ分画を含んでいる。

好ましい可溶性 $\text{h}\text{u}\text{T}\text{F}\text{h}$ タンパク質は第1図で示されているところの、アミノ末端の残基約1番から、209番を経由してカルボキシ末端の残基約224番を示すアミノ酸残基を示している。従って、好ましい可溶性 $\text{h}\text{u}\text{T}\text{F}\text{h}$ タンパク質は第1図で示すところの約1番から約209番、約1番から約219番及び約1番から約224番の残基で表わされるアミノ酸残基配列を有するものである。

好ましい可溶性 $\text{p}\text{l}\text{e}\text{c}\text{h}\text{u}\text{T}\text{F}\text{h}$ タンパク質は、第1図で示すところの、アミノ末端の-32番から、209番を経由して、カルボキシ末端の224番の残基で表わされるアミノ酸残基を有している。従って、好ましい可溶性 $\text{p}\text{l}\text{e}\text{c}\text{h}\text{u}\text{T}\text{F}\text{h}$ タンパク質は、第

下、血管系液状サンプルを凝集する能力を意味する。凝集能力を検定するのに十分な、典型的 $\text{h}\text{u}\text{T}\text{F}\text{h}$ タンパク質濃度は、例2におけるサンプル/ $\text{h}\text{u}\text{T}\text{F}\text{h}$ 比と同じ比を用いたとき、約0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ から約1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは、約1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ から約10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、そしてより好ましくは約10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ から約100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ である。もちろん、凝集能を検定するときに必要な濃度よりも高い濃度であるが、好ましい濃度に希釈しうる $\text{h}\text{u}\text{T}\text{F}\text{h}$ 溶液も考慮されている。

好ましい形態において、 $\text{h}\text{u}\text{T}\text{F}\text{h}$ 含有水溶液は、リン脂質又は非イオン性界面活性剤中に分散された $\text{h}\text{u}\text{T}\text{F}\text{h}$ を含んでいる。典型的リン脂質： $\text{h}\text{u}\text{T}\text{F}\text{h}$ タンパク質質量比は、約5:1から12000:1、好ましくは、約50:1から約5000:1そしてさらに好ましくは、約100:1から2500:1の範囲である。

G: ポリペプチド

本発明の各ポリペプチドは、せいぜい約50個、より通常には約35個以下の、そして好ましくは約25個以下のアミノ酸残基を含んでおり、かつ、少なくとも10個の残基を含んでいる。さらに、本発明のポリペプチドは、そのアミノ酸残基配列及び新しい機能特性を特徴としている。

従って、本発明のポリペプチドの1つの形態は、血液凝固因子Ⅷ/VIIIへの $\text{h}\text{u}\text{T}\text{F}\text{h}$ の結合を競合的に阻害する能力をその特徴の1部としている、 $\text{h}\text{u}\text{T}\text{F}\text{h}$ 結合部位ポリペプチド類似物である。本発明の結合部位類似物は活性化した複合体を作ることなく、すなわち、凝集を開始することなく因子Ⅷ/VIIIに結合することが望ましい。

ここで用いている“複合体”という言葉は、抗原-抗体又は、

1図で示すところの約-32番から214番、約-32番から219番、及び約-32番から約224番の残基で表わされるアミノ酸残基配列を有するものである。

1つの形態において、 $\text{h}\text{u}\text{T}\text{F}\text{h}$ 及び $\text{p}\text{l}\text{e}\text{c}\text{h}\text{u}\text{T}\text{F}\text{h}$ 発生物はグリコシル化されていない。すなわち、それらは、本発明のrDNAでトランスフォームした原核細胞中で生産される。

非グリコシル化型の $\text{h}\text{u}\text{T}\text{F}\text{h}$ 及び $\text{p}\text{l}\text{e}\text{c}\text{h}\text{u}\text{T}\text{F}\text{h}$ は、本発明の接種物及び診断システムにおける免疫原及び抗原として有用である。

典型的には、真核細胞で生産された $\text{h}\text{u}\text{T}\text{F}\text{h}$ 及び $\text{p}\text{l}\text{e}\text{c}\text{h}\text{u}\text{T}\text{F}\text{h}$ はグリコシル化されており、また抗原性及び免疫原性に加えて、生物学的活性を有する。ここで用いられているように、“生物学的活性”という語句は、因子Ⅷ/VIIIの依存の凝集を誘導する能力をもつ $\text{h}\text{u}\text{T}\text{F}\text{h}$ 又は $\text{p}\text{l}\text{e}\text{c}\text{h}\text{u}\text{T}\text{F}\text{h}$ タンパク質又はポリペプチドを指して使われる。

このように、本発明は、実質的にヒトの組織因子絆類タンパク質を含まない生物学的に活性な $\text{h}\text{u}\text{T}\text{F}\text{h}$ を有する水溶液を含む組成物を考案している。その組成物も実質的に例えラウリル硫酸ナトリウム等のイオン性界面活性剤、ポリアクリルアミド及びSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)で測定される約、15000ダルトン以下の見かけの分子量を有する組織由来のタンパク質のような物質を含まないことが望ましい。

水溶性の $\text{h}\text{u}\text{T}\text{F}\text{h}$ 含有溶液は血液又はクエン酸化した血漿のような血液由来の蛋白物のようない血管系液状サンプルの凝集能力を検定するのに十分な生物学的に活性のある $\text{h}\text{u}\text{T}\text{F}\text{h}$ を含んでいる。“凝集能力”という語句は生物学的に活性な $\text{h}\text{u}\text{T}\text{F}\text{h}$ を有

レセプター-リガンド反応のような特異的結合反応の産物を意味している。代表的複合体としては、免疫反応産物及びここでIFIⅧ/VIIIと示されているところの組織因子-因子Ⅷ/VIII結合反応産物がある。

好ましい形態において、 $\text{h}\text{u}\text{T}\text{F}\text{h}$ 結合部位類似物は、少なくとも第1図に示されている30～35番のアミノ酸残基を表わしている次に示すアミノ酸残基配列：

-VNQVYTT-

を含んでいる。

さらに好ましくは、 $\text{h}\text{u}\text{T}\text{F}\text{h}$ 結合部位類似物は、少なくとも、次のアミノ酸残基配列：

-VNQVYTTVQIST-
-LYYWKKSSSGKKT-

のうちの1つを含んでいる。

これらの配列は、第1図で示すところの各々、30～40及び155～167番の、 $\text{h}\text{u}\text{T}\text{F}\text{h}$ のアミノ酸残基を示している。

さらに一度好ましい場合は、 $\text{h}\text{u}\text{T}\text{F}\text{h}$ 結合部位類似物は第1図で示すところの、各々26～49番及び146～167番で表わされている、次のアミノ酸残基配列：

-EPKPVNVVYVQISTKSKDNXSKC-
-VFCKDLIYTLYWKSSESSGKKT-

からなる群から選ばれたアミノ酸残基配列を含む。

好ましい $\text{h}\text{u}\text{T}\text{F}\text{h}$ 結合部位ポリペプチド類似物は第1表で示されているアミノ酸残基配列を含んでいる。

第 1 表
名 称 アミノ酸残基配列

各ポリペプチドの実験名は第1図の、含まれているアミノ酸残基配列を表わしている。

ポリペプチド26～49、2146～167及び2161～189も、抗トロTF_h抗体分子がトロTF_hに結合するのを中心（競争的阻害）する能力を特徴としている。抗トロTF_h抗体のトロTF_hへの結合を中和する能力をもつ本発明の他のポリペプチドは、第2表に示されているものである。

第 2 表
名 称 アミノ酸残基配列

実験名に付けられた“C”は、タンパク質結合のためのリンカーとして、示されている配列に付け加えられたシスティ

れる。リングに使われる典型的アミノ酸残基は、チロシン、システイン、リジン、グルタミン酸及びアスパラギン酸とそれに関連するものである。さらに、本発明のポリペプチドは、末端N_α、C_αアシル化、例えばアセチレーリング又はオメガリコン酸アミデーション、ターミナルカルボキシアミデーション、例えば、アンモニア、メチルアミン、その他により配列が修飾を受けていることで、天然の配列とは異なることがある。

キャリヤー・ハブテンのよう、当分野でよく知られているリンカーを介してのキャリヤーとの結合の場合、本発明のポリペプチドは、トロTF_hと免疫反応する抗体を誘導することができる。免疫学的な交差反応性の明白な原則からみて、本発明は、第1表及び第2表で示されているポリペプチドの抗原的に関連したパリアントも考慮している。“抗原的に関連したパリアント”とは、第1表もしくは第2表のポリペプチドの、少なくとも5個のアミノ酸残基配列領域を含み、かつ、第1表又は第2表のポリペプチド及びトロTF_hと免疫反応を起こす抗体分子を誘導することができるポリペプチドのことである。

また、ポリペプチドがリン脂質又は非イオン性界面活性剤中に分散した、トロTF_h結合部位ポリペプチド類似物の水性溶液を含む組成物を、本発明は考査している。典型的なリン脂質：ポリペプチド重量比は、約5:1から200:1、好ましくは約30:1～80:1、さらに好ましくは、約45:1～55:1の範囲にある。リン脂質中に分散して使用するのに適している好ましいトロTF_h結合部位類似物をセクションIIの第4表にリストした。

本発明のポリペプチドは、ポリペプチドの分野でよく知られているいくつかの方法で合成することができる。使用しうる多くの技術のすぐれたまとめは、J. H. スチワード (Steward) 及び

シ残基を示している。

本発明のポリペプチドは、そのポリペプチドが因子H₁/M₂ヘの結合に対し、本来の組織因子と競合でき、そして、または、トロTF_hに対する抗体トロTF_h抗体分子の結合を競合的に阻害しうるかぎり、トロTF_hのアミノ酸残基配列と同一である必要がないことを理解すべきである。それ故、本ポリペプチドは、使用する際に有利となるような、保存的、非保存的にかかわらず持入、欠失及び置換のような種々の変化を与えることができる。

保存的置換には、あるアミノ酸残基が他の生物学的に同様の残基に置き換ったものである。保存的置換の例には、イソロイシン、バリン、ロイシン又はメチオニンのような疏水的残基間の置換又は、アルギニンとリジン、グルタミン酸とアスパラギン酸又はグルタミンとアスパラギン及びそれに類するもののような極性残基間の置換がある。また“保存的置換”という語句には、もし、ポリペプチドが、必要とされる結合活性を示すならば、未置換の元々のアミノ酸の代りに、置換されたアミノ酸を置いることも含まれる。

本発明のポリペプチドが、1つ以上の保存的、もしくは非保存的置換をしているために、本来のトロTF_hの配列と同一ではない場合、本発明のポリペプチドがラベル又は固体マトリックス、又はキャリヤーにうまく固定する“リンカー”を提供する目的で、その各末端に付加的残基をつけ加える場合は別にして、アミノ酸残基の通常せいぜい約20パーセント、より普通には、せいぜい10%が置換している。本発明のポリペプチドと共に使用されるラベル、固体マトリックス及びキャリヤーは以下に述べる。

通常、アミノ酸残基リンカーは、少なくとも1残基であり、また40以上の残基のこともあります、しばしば1～10残基が用いら

J. D. ヤング (Young) の“固相ペプチド合成” (1969年、サンフランシスコ、H. K. フリー・マン (Freeman) 社) 及びJ. メイエンホーファー (Meienhofer) の“ホルモン性タンパク質及びペプチド” (1983年、アカデミックプレス社 (ニューヨーク) 、2巻、46頁) が固相ペプチド合成について、またE. シュローダー (Schroeder) とK. クブケ (Kubke) の“ペプチド” (1965年、アカデミックプレス社 (ニューヨーク) 1巻) が古典的な液相法について行なわれている。

B. 接種物

別の船積において、本発明のポリペプチド又は、その抗原的に関連したパリアントは、生理学的に許容しうる水性粘稠剤組成物として、その効果的量が投与された時、トロTF_hと免疫反応する抗体を誘導することができる接種物となる。種々の文法型の“接種物”という語は、トロTF_hに対する抗体の構造に用いられる活性成分として、本発明のポリペプチドを含む組成物として、ここで使用されている。ポリペプチドの抗体を誘導するのに用いられるとき、そのポリペプチドは、単独で、又は結合体としてキャリヤーと結合して、又は、ポリペプチド複合体として用いられるのであるが、表現の簡便性のため、本発明のポリペプチドの種々の接種は、全て、“ポリペプチド”という語及びその種々の文法型で呼ばれていることを理解されよう。

約35以下のアミノ酸残基を含むポリペプチドに対し、すでに記されているように抗体生産の誘導のためには、キャリヤーに結合したペプチドを使用する方が望ましい。

すでに記してきたように、1つ以上の付加的アミノ酸残基をポリペプチドのキャリヤーへの結合を助けため、そのポリペプチドのアミノ又はカルボキシ末端に付加することができる。ポリペ

特表平1-503438(13)

ポチドのアミノ又はカルボキシ末端へ付加したシスティン残基は、ジスルフィド結合を介して、結合体を作るのに特に有用であることが分っている。しかし、結合体を調整の当分野でよく知られている他の方法も使用しうる。代表的付加結合法にはミカエル付加反応産物、グルタルアルデヒドのようなジアルデヒド（クリップスタイン（Kilipstein）等（ジャーナル・オブ・インフェクション・ディセーズ（J. Infect. Dis.））、147巻、318～326頁、
(1983年)）及びそれに類するものの使用、又は、キャリヤーに対し、アミド結合を生ずる、水溶性カルボキシミドの使用ような、カルボキシミド法の使用が含まれる。活性官能基を介してのタンパク質の結合については、オーラメアス（Auramex）等のスカンジナビアン・ジャーナル・オブ・イムノロジー（Scand. J. Immunol.）8巻、補1、7、7～23頁（1978年）を参照せよ。

有用なキャリヤーは、当分野ではよく知られており、一般的にはタンパク質そのものである。そのようなキャリヤーの代表例としては、キーホール、リンベット、ヘモシアニン（KLH）、エステチン、チログロビン、子ウシ血清アルブミン（BSA）やヒト血清アルブミン（HSA）のようなアルブミン類、ヤギ赤血球（SRBC）のような赤血球類、チタナストキソイド、コレラトキソイド、ポリ（D-リジン：D-グルタミン酸）のようなポリアミノ酸及びこれに類するものがある。

キャリヤーの選択は、その接種物の最終的使用法に依存しており、本発明に特に関係しない基準に基づいている。例えば、接種される動物中で不都合な反応を起こさないキャリヤーが選択されるべきである。

本発明の接種物は、典型的には、キャリヤーに結合した結合物

びイムノグロブリン分子の免疫学的に活性な領域すなわち抗体結合部位又はパラトープを含む分子を意味する。代表的抗体分子には、本来のイムノグロブリン分子、実質的に本来のものと同じイムノグロブリン分子及びF(ab)、F(ab')、F(ab')₂及びF(v)として、当分野で知られている領域を含む、パラトープを含有する、イムノグロブリン分子の一部がある。

本発明の抗体組成物は、huTF_h及び本発明の特異的ポリペチドの少なくとも1つと免疫反応を起こす抗体分子を含むことを特徴とする抗体ペプチド抗体である。

例えば、huTF_h及び組織因子結合部位のポリペプチド類似物と免疫反応する抗体分子を含む、本発明の抗体組成物は組織因子が因子VII/VIIaと結合する能力を中和できる。従って、好ましい抗体組成物は、huTF_h及びp26-49又はp146-157と反応し、かつ、p204-226と実質的に免疫反応しない抗体分子を含むものである。huTF_hに対して生ずるポリクローナル抗血清は、p204-226と免疫反応する抗体を含むことに注意すべきである。このように、抗204-226免疫反応性が実質的にないことが、本抗体組成物と従来の報告されているものとを区別する特性となっている。

本発明の抗体組成物の典型的生成は、水乳動物を、本発明の接種物で免疫化し、適当なポリペプチド免疫特異性を有する水乳頭抗体分子を誘導することによって行なわれる。さらに、その抗体分子をその水乳動物から収集し、例えば、免疫アフィニティ・クロマトグラフィーのような従来技術によって、その必要量を準備する。このように生成した抗体組成物は、ながらく、診断法及び身体サンプルにおけるhuTF_hを検出するための、本発明のシステムで用いることができる。

として、効果的な免疫原性の本発明のポリペプチドを含む。他の事項の中で、単位投与量当たりの効果的なポリペプチド量は、当分野ではよく知られているように、接種される動物種、その動物の体重及び選択した接種レジメンに依存する。典型的に、接種物は、接種（投与）当たり約1.0マイクログラムから約5.0ミリグラム、好ましくは、約5.0マイクログラムから約5.0ミリグラムのポリペプチドを含んでいる。

本発明の接種物に用いられている“単位投与”という語句は、各ユニットが、必要とする希釈剤、すなわち、キャリヤー又はビヒクルと共に望ましい免疫的効果を及ぼすのに必要な予め決められた量の活性物質を含む、動物に対する1回の投与に適した物理的に分離した単位を意味する。本発明の接種物の新しい単位投与に関する明細は、同活性物質の独特的特性及びその独自の免疫学的效果、及び向こうで詳細に公開されている動物中の免疫学的使用に内在する制限により説明され、かつ直接依存しており、これらが本発明の特徴となっている。

典型的には、接種物は、水、食塩水又はリン酸緩衝食塩水などの生理学的に許容された（受容できる）希釈剤中にポリペプチド結合体を分散させることにより、乾燥した固体のポリペプチド結合体から水性組成物を調製することができる。

また、接種物は希釈剤の一部として、アジュバントを含んでいる。完全フロイントアジュバント（CFA）、不完全フロイントアジュバント（IFA）及びミ.ウバンのようなアジュバントは、当分野ではよく知られており、いくつかの会社から市販されている。

1. 抗体及び抗体組成物

種々の文法型の“抗体”という語は、イムノグロブリン分子及

モノクローナル抗体組成物も、本発明で考案されている。検出限界内で、モノクローナル抗体組成物は、効果的にhuTF_hを結合しうる、唯一種類の抗体結合部位を含んでいる。従って、典型的に、本発明のモノクローナル抗体組成物は、それがhuTF_h以外のタンパク質を結合できる抗体をたとえ含んでいたとしても、huTF_hへの結合親和性を示す。ひとつの抗体において、モノクローナル抗体組成物は、huTF_h及び、組織因子結合部位のポリペプチド類似物、好ましくはp26-49又はp146-157と免疫反応する抗体分子を含んでいる。

他の症例において、本発明は、huTF_hと免疫反応し、huTF_hにより開始する凝集を阻害する抗体分子を含む抗凝集（中和）MoAbを考案した。さらに凝集を阻害する好ましいMoAbは本発明のポリペプチド、好ましくは、huTF_h結合部位ポリペプチド類似物、及びさらに好ましくは、第1表で示されているポリペプチドと免疫反応することを特徴とする。

他の症例において、抗凝集MoAbは、huTF_h及びhuTF_h：因子VII/VIIaの複合体と免疫反応し、huTF_hによって開始する凝集を阻害（中和）する抗体分子を含んでいる。さらに、好ましい抗凝集MoAbはhuTF_hポリペプチドp1-30又はp26-49と免疫反応することを特徴とし、またこれは、huTF_hポリペプチドp56-71と免疫反応しないことが好ましい。

また、本発明は、組織因子の凝集を開始する能力を中和しない抗体分子を含む非中和性モノクローナル抗体組成物も考案した。そのような組成物は、huTF_h及びポリペプチドp1-30と免疫反応し、かつ、ハイブリドーマTF9-10H10により生成（分泌）される抗体分子を含むことが望ましい。

本発明のモノクローナル抗体組成物は、適当なポリペプチド特

特表平1-503438 (14)

異性をもつ抗体分子を分認するハイブリドーマを含有する栄養培地を含む、モノクローナルハイブリドーマの培養を開始することによって生産することができる。

このハイブリドーマが培地中に、その抗体分子を分認するのに十分な条件及び時間、培養を維持する。それから、抗体含有培地を収集する。さらにこの抗体分子を從来法により単離する。

これらの組成物の調製に有用な培地は、当分野ではよく知られておりまた、市販されていて、合成功能培地、同血統繁殖マウス及びそれに類するものが含まれている。代表的合成功能培地は、4.5% /Mのグルコース、2.0% グルタミン及び2.0% ウシ胎児血清を補足した、ダルベコ最小培地 (DMEM:ダルベコ(Dulbecco)等、ヴィロジー (Viro)、8巻、396頁(1959年)) である。代表的同血統繁殖マウス株はBalb/cである。上述の方法で生産したモノクローナル抗体組成物は、例えば、huTFを含有免疫反応の形成が必要である、診断及び治療法で用いることができる。

J. ハイブリドーマ

本発明のハイブリドーマは、huTFと免疫反応する抗体分子を生産することを特徴とする。さらに、好ましいハイブリドーマは、huTFで開始する凝集を阻害し、また、望ましくは、本発明のポリペプチド、好ましくは、huTF結合部位ポリペプチド類似物、そしてさらに好ましくは、第1表に示されているポリペプチドと免疫反応する抗体分子を生産することを特徴としている。さらに好ましい組様においては、抗凝集MoAbは、非ヒト、非長環、T1と免疫反応する。

他の好ましい組様において、本発明のハイブリドーマはhuTF及びhuTF-hu因子VII/VIIIの複合体と免疫反応し、huTF

により開始する凝集を中和する抗体分子を生産する。さらに、huTF-hu因子VII/VIIIの複合体と免疫反応するハイブリドーマ生産抗体は、該抗体の、huTF-huポリペプチド1-30又は26-49、好ましくはその両方と免疫反応し、かつ、より好ましくは、該抗体分子が、ポリトロTF-huポリペプチドp56-71とは免疫反応を起こさないことを特徴としている。

望ましい免疫特異性を有する、すなわち、特別なタンパク質をして、またはポリペプチドと免疫反応する抗体分子を生産する(分認する)ハイブリドーマの作成法は、当分野ではよく知られている。特に、ニマン (Nisam) 等により報告されたハイブリドーマ技術は(プロシーディング・イン・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci.) U.S.A.、80卷、4949~4953頁(1983年))、有用である。好ましいハイブリドーマを、例13の第5表に示した。

ハイブリドーマ培養物TF8-5G9、TF9-5B4及びTF9-10H10はブケベスト協定に従がい、1987年3月27日ATCCに保管され、各々受番号、HB9382、HB9381及びHB9383が割り当てられた。

K. 治療方法及び組成物

本発明のhuTF-hu因子VII/VIIIの結合部位ポリペプチド類似物、抗体組成物、モノクローナル抗体組成物及び抗凝集MoAbは各々、生体内において、組織因子による因子VII/VIIIの結合を調節するのに用いることができる。

例えば、huTF-hu因子VII/VIIIの結合部位ポリペプチド類似物は、効果量を被投与者に投与したとき、因子VII/VIIIの組織因子への結合を競争的に阻害することができる、医療的に許容しうる組成物に用いることができる。この阻害は、組織因子-因子VII/VIII

VIII複合体形成速度の減少によると考えられている。従って、生体内において、huTF-hu因子VII/VIII結合部位ポリペプチド類似物の投与は、凝集やある炎症反応のような、組織因子の因子VII/VIIIへの結合により開始する生理学的応答を調節するのに用いることができる。好ましい組様において、このポリペプチドは、先に述べたように、リン脂質中に分離して投与される。

生体内における組織因子による因子VII/VIIIの結合を調節する他の方法は、本発明の抗体組成物(抗ペプチド抗体)又は抗凝集MoAbの効果量を静脈注射により投与することである。この抗体分子には、パラトビック領域を含み、かつイムノグロブリン分断片F(ab')₂、Fab及びそれに類するもののような、Fc領域を含まないものである。治療的に効果的量の抗凝集MoAbは、体重当たり1.5mgから5mg、好ましくは体重当たり約1.0mgから約5mg、より好ましくは、体重当たり約1.5mgから約5.0mgの範囲である。

他の組様において、本発明のMoAb、抗凝集MoAb又は非中和性MoAbの抗体分子を抗凝集試薬に結合し、抗凝集治療組成物が作られる。このようにして作った、効果量の抗凝集治療組成物を、その表面に組織因子を発現する腫瘍細胞を有する被投与者に投与することができる。このような腫瘍細胞の代表例は、胸及び肺のがん細胞である。

ここで考察された抗凝集試薬の代表例には¹¹¹I、¹¹³In、¹¹³Bi及びこれに類するもののような放射性体標がある。放射性核種結合モノクローナル抗体治療組成物の製造法及びその使用法は、コザック (Kosak) 等 (トレンド・イン・バイオテクノロジー (Trends in Biotech.) 4巻、259~264頁(1986年)) により報告されている。

投与されたポリペプチド又は抗体分子含有組成物は、溶液又はサスペンションの形をしているが、ポリペプチドは、琥珀、丸薬、カプセル、放出持続剤又は粉末の形もとる。どの場合にも、この組成物は、0.10%~9.5%、好ましくは、2.5%~7.0%の活性成分を含んでいる。

活性成分としてポリペプチド又は抗体分子を含む治療組成物の調製は、この分野ではよく知られている。典型的には、このような組成物は、液体溶媒又はサスペンションのような注射可能な形に調製されるが、注射前の液体溶媒又はサスペンションを作るのに適している固体形としても調製される。またこの固形物はエマルジョン化されることもある。この活性治療成分は、しばしば、医療的に許容でき、かつ、活性成分に適合する賦形剤と混合する。例えば、典型的賦形剤としては、水、食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノール又はそれらに類するもの及びこれらの組合せたものがある。加えて、もし、望ましいなら、この組成物は、加湿剤又はエマルジョン化剤、pH緩衝剤のような、活性成分の効果を促進する補助物質を少量含ませることも可能である。

ポリペプチド又は抗体分子組成物は、中和した医療的に受容しうる塩の形に調整することもできる。医療的に受容しうる塩には、酸性加塩(ポリペプチド又は抗体分子の遊離しているアミノ基で形成される)及び、例えば、塩酸又はリン酸のような無機酸又は、硫酸、シウ酸、酒石酸、マンデル酸のような有機酸及びこれらに類するもので形成されるものがある。遊離したカルボキシル基で形成する塩も、例えば、ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム又は鉄の水酸化物のような無機塩及びイソプロピルアミン、トリノチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカイン及びこれらに類するもののような有機塩が

特表平1-503438(15)

とサンプルの相対量、試薬/サンプル混合物の維持時間、温度、バッファ条件及びそれに依するもののような、少なくとも1回の検定法のパラメーターを明確に記述してある。

好ましい態様において、さらに、本発明の診断システムは、試薬を含む複合体の形成を知らせるラベル又は指示手段を含んでいる。

ここで用いられているように、種々の文法型の“ラベル”及び“指示手段”は、複合体の存在を示す検出可能な信号を産み出すのに直接又は間接的に関連する單一の原子及び分子を意味する。“体内”ラベル又は指示手段とは、被検者の体内で有用なものである。どのラベル又は指示手段も、本発明の抗体又はモノクローナル抗体組成物の一部である抗体分子、発現したタンパク質、又はポリペプチドに結合又は組込まれていることもあるし、また別々に使用されることもあり、また、これらの原子又は分子は付加的試薬と組合せて、又は単独で使用されうる。このようなラベルは、臨床的診断化学においては、よく知られているものであり、それらが、他の新しいタンパク質、方法、そして、又はシステムとともに使用されるときに限り、本発明の一部を構成する。

ラベルの結合、すなわち、ポリペプチド及びタンパク質のラベル化は、当分野ではよく知られている。例えば、ハイブリドーマによって生産される抗体分子は、培養培地中の成分として与えられたとき、放射性同位元素含有アミノ酸の代謝的取込みによるラベル化が可能である。例えば、ガルフレ (Galfre) 等の、メソッド・イン・エンザイモロジー (meth. Enzymol.) 7-3巻、3-45頁 (1981年) 参照。活性化官能基を介するタンパク質の結合又はカップリング技術は特に有用である。例えば、オーラメアス (Auramess) 等の、スカンジナビアン・ジャーナル・オブ・

ら説明される。

治療用のポリペプチド又は抗体分子含有組成物は例えば、単位投与量の注射によるように、局所的に又は静脈注射により簡便に投与される。

本発明の治療組成物に対して用いられる“単位投与”という語句は、ヒトに1回投与するに適した、必要とされる希釈剤、すなわち、キャリヤー又はビヒクルと共に、望ましい治療効果をあげるために計算された、予め決められた量の活性物質を含む、物理的に分離されている単位を意味する。

該組成物は、投与物形状に適した方法で、治療的に効果的な量が投与される。投与される量は処置される検体、活性成分を利用する検体の血液凝固システムの容量及び望ましい組織因子結合能の阻害又は中和度に依存する。投与される必要のある活性成分の精密な量は、医師のは断に依存し、かつ、各個人によつても異なる。しかし、適切なポリペプチド投与範囲は、1日に、患者あたり、1から5ミリグラムの活性物質というオーダーであり、投与の様数に依存する。第1回投与及び二次免疫の適正な治療計画もいろいろであるが、典型的には、一次投与後、1時間以上の間隔において、さらに注射又は他の方法による投与が振り返される。別に、血液中、10ナノモル濃度から10マイクロモル濃度を維持するのに十分な、持続的静脈注入法も考案されている。

D. 診断システム

本発明のキット型の診断システムは、少なくとも1回の検定に十分な量の、分包試薬として、本発明の発現タンパク質ポリペプチド、抗体組成物又はモノクローナル抗体組成物を含んでいる。また、この分包試薬の使用説明書も含まれているのが普通である。

典型的に、“使用説明書”には、試薬濃度には、混合する試薬

イムノロジー (Scand. J. Immunol.) 8巻、補版7巻、1~23頁 (1978年)、ロッドウェル (Rodwell) 等の、バイオテクノロジー (Biotech.)、3巻、889~894頁 (1984年) 及び米国特許第4,493,795号参照。

また、診断システムは、好ましくは分包の、特異的試薬を含む。“特異的結合試薬”は、本発明の試薬を選択的に結合できる分子であるが、本発明のタンパク質発現産物、ポリペプチド又は抗体分子そのものではない。代表的な特異的結合試薬は、抗体分子、補体タンパク質又はその断片、タンパク質A、血液凝固因子V/Va、子ウシ組織因子及びそれに類するものがある。この特異的結合試薬は、反応物が複合体の一端として存在するとき、これと結合することが望ましい。

好ましい態様において、特異的結合試薬はラベル化される。しかし、その診断システムが、ラベル化されていない特異的結合試薬を含むとき、典型的には、この試薬は、堆積手段又は試薬として用いられる。これらの態様において、このラベル化した特異的結合試薬は、この堆積手段が、反応種含有複合体に結合しているとき、この堆積手段に特異的に結合することができる。

本発明の診断キットは、血清、血液又は尿のような体液サンプル中の抗原の存在又は量を検出するのに“イライザ法”方式で用いることができる。“イライザ法”は、サンプル中に存在する抗原又は抗体量を検出及び定量するため、固相に結合した抗体又は抗原及び酵素-抗原又は酵素-抗体結合物を用いた、酵素結合免疫吸着検定法のことである。イライザ法の説明は、全て参考としてここに組込まれている、1982年、C A州ロサンゼルスのラング・メディカル・パブリケーションから出版された、D. P. サイツ (Sights) 等の基本的及び臨床的免疫学、第4編、

第22章及び米国特許第3,654,090号、第3,850,752号及び第4,016,043号に報告されている。

このように、好ましい態様において、本発明の発現したタンパク質、ポリペプチド又は抗体は固相マトリックスに固定され、この診断システム中に、分包されている固体サポートを形作っている。

典型的に、この試薬の固体マトリックスの固定は、他の固定法もあるが、この分野でよく知られている水性媒材からの吸着が用いられている。

有用な固体マトリックスは、当分野でよく知られている。このような物質には、フルマシア・ファイン・ケミカルズ社 (NJ州、ビスカタウェイ) から、セファデックスという登録商標で市販されている、架橋デキストラン；アガロース；1 L州、北シカゴ、アボット・ラボラトリーズ社から市販されている直径約1ミクロン～約5ミリメートルのポリスチレンビーズ；シート状、ヒモ状又はヘラ状のポリ塩化ビニルポリスチレン、架橋ポリアクリルアミド、ニトロセルロース又はナイロンベースの織物、又は、ポリスチレン又はポリ塩化ビニルでできているチューブ、プレート又はマイクロプレートのウェルが含まれる。

ここで述べられている診断システムの試薬、ラベル化結合試薬又は、堆積試薬は、液体分散物として溶媒として、又は、例えば、凍結乾燥型のような、実質的に乾燥粉として提供される。指示手段が酵素である場合、この酵素基質も、システムの別の包みに提供される。先に述べた、マイクロプレートのような固体サポート及び1つ以上のバッファも、この診断検定システム中に別にパッケージされた要素として含まれている。

診断システムに関連して、ここで総説されているパッケージは、

特表平1-503438 (16)

診断システムにおいて通常使われるものである。このようなパッケージには、ガラス及びプラスチック型の（例えば、ポリエチレン、ポリプロピレン及びポリカーボネート）ガトル、バイアル、プラスチック及びプラスチックボイルでラミネートした外袋及びこれらに類するものが含まれている。

1. 検定法

本発明は、本発明の抗体又はモノクローナル抗体組成物中に含まれている、発現されたタンパク質、オリペプチド又は抗体分子を含む複合体を生産することによりトロTF_hを検出する方法を考案した。当業者には、これらの複合体を形成するのに利用できる多くの、よく知られている臨床的診断の化学手段があることが理解できよう。従って、典型的検定方法がここで説明されているが、これは、本発明を制限するものではない。

1. 血栓検出

被検者中に存在する血栓検出性が考査された。生体内での指示手段と結合する抗体を含む本発明の、効果的量のモノクローナル抗体組成物を、被検者に静脈注射する。好ましい態様において、ラベル化した抗体は、¹¹¹I-TF_h及び第1表及び第2表のオリペプチドと免疫反応するが²⁰⁴T-226とは反応しないもので、好ましくはハイブリドーマTF_{8-5G9}、TF_{9-5B4}又はTF_{9-10H10}から生産されたものである。

それから被検者を、ラベル化した抗体分子が、血栓の一部に存在する¹¹¹I-TF_hと反応し、複合体を作るのに十分な決められた時間、及び、好ましくは、未反応の抗体分子が体内から一掃されるのに十分な付加的時間維持する。その後、被検者を、生成した複合体の存否及び好ましくはその位置について検定する。

2. 身体サンプル中のトロTF_hの検出

トした。

その後、残留脂組織固体を各々、その固体をヘプタン：ブタノール（2：1）、2.5ミリリットル（ml）当り、組織固体1gの割で、ヘプタン：ブタノール（2：1）と混合することによって行う5回の抽出を行ない、ついで滤過により、その固体を回収する。最後の滤過後、残留脂組織固体を再び大気圧下、約20℃一晩で乾燥し、脱脂脂組織粉末を作り、必要になるまで、-80℃に保存する。

つづいて、脂組織粉末2.5グラムをTBS/EDTAバッファ（100mMリモル濃度（M）NaCl、50mMトリス・塩酸（pH 7.5）、0.02%アジ化ナトリウム、5mMエチレンジアミン四酢酸（EDTA）、0.1M（V/V）トリトンX-100（オリアリルエチレン-9-オクチルフェニルエーテル））500mlと混合し、ついで4℃で一晩攪拌する。さらにこの混合物を15,300×gで1時間遠心する。生じたベレットを500mlのバッファA（100mMNaCl、50mMトリス・塩酸（pH 7.5）、0.02%アジ化ナトリウム、2%トリトンX-100）に再懸濁し、スラリーを作る。室温で1時間の攪拌後、このスラリーを上述のように遠心する。生じた上清を回収し、凍結乾燥した後、100mlのバッファAに溶かして、¹¹¹I-TF_h含有脂抽出溶液を作る。

2. ¹¹¹I-TF_hの凝血活性を測定するための凝血検定法

¹¹¹I-TF_hプロコアグラン特活性を、37℃に維持した、全試薬及び混合物を用いて行う、1段階凝血検定法で測定した。血漿と同容積の、2.0Mクエン酸ナトリウム2水和物及び140mM NaCl（pH 7.4）を含む溶液を混合することにより、正常なヒト血漿をクエン酸化した。TBS/BSA溶液（150mMNaCl、

身体サンプル、好ましくは液体サンプル中のトロTF_hの存在、及び好ましくはその量を検出するため、競合的又は非競合的な、種々の不均一及び均一検定法が利用できる。例えば、液体液体サンプルと、ラベル化したp26-49を、マイクロプレートのウエルの内壁に固定した、ハイブリドーマTF_{8-5G9}又はTF_{9-10H10}から生産された抗体分子を含む固体サポートと混合し、固液相免疫反応混合物を作る。この混合物をサンプル中に存在するトロTF_h及びラベル化したp26-49が、固体サポートとして存在する抗体分子への結合を競争し、固相免疫反応物を形成するのに十分な時間、生物学的検定条件下に維持する。未結合のラベル化p26-49を、免疫反応産物から取り除く。その後、免疫反応産物として結合したラベル化p26-49の量を測定し、その差により、¹¹¹I-TF_hの存在を検定できる。

例

次に示す例は、本発明の説明を意図したもので、これを制限するものではない。

1. 組織因子含有ヒト脂抽出物の調製

生検で得られた正常なヒトの脳を12時間以内に処理するかもしくは、-80℃に保存する。その筋膜及び大脛を除き、ついで残存する筋部分を、ボリトロンホモジナイザー（NY、ウェストバリー、プリシクマン、インスツラメント社）を用いて、等容量の冷（0℃）アセトン中でホモジネートした。このホモジネートしたものをさらに3倍容の冷アセトンと混合し、その組織固体部分を、焼結ガラスロートを用いて滤過して回収した。各々7回の2倍容の冷アセトンとの混合及び引きつづく滤過により、残留固体からアセトン可溶性物質を抽出した。最後の滤過の後、残存するアセトンを、20℃、一晩、残留固体から大気圧下でエバボレ

ートした。

その後、残留脂組織固体を各々、その固体をヘプタン：ブタノール（2：1）2.5ミリリットル（ml）当り、組織固体1gの割で、ヘプタン：ブタノール（2：1）と混合することによって行う5回の抽出を行ない、ついで滤過により、その固体を回収する。最後の滤過後、残留脂組織固体を再び大気圧下、約20℃一晩で乾燥し、脱脂脂組織粉末を作り、必要になるまで、-80℃に保存する。

つづいて、脂組織粉末2.5グラムをTBS/EDTAバッファ（100mMリモル濃度（M）NaCl、50mMトリス・塩酸（pH 7.5）、0.02%アジ化ナトリウム、5mMエチレンジアミン四酢酸（EDTA）、0.1M（V/V）トリトンX-100（オリアリルエチレン-9-オクチルフェニルエーテル））500mlと混合し、ついで4℃で一晩攪拌する。さらにこの混合物を15,300×gで1時間遠心する。生じたベレットを500mlのバッファA（100mMNaCl、50mMトリス・塩酸（pH 7.5）、0.02%アジ化ナトリウム、2%トリトンX-100）に再懸濁し、スラリーを作る。室温で1時間の攪拌後、このスラリーを上述のように遠心する。生じた上清を回収し、凍結乾燥した後、100mlのバッファAに溶かして、¹¹¹I-TF_h含有脂抽出溶液を作る。

2. ¹¹¹I-TF_hの凝血活性を測定するための、因子V含有固体サポートの調製

ヒトの因子V₁/V₂を参考文献として記載されている、フェア（Fair）の報告（プラッド（Blood）、62卷、786～91頁（1983年））に従って準備した。この準備した因子V₁/V₂を、アガロース固体マトリックスに結合するため、4℃で一晩、その5ミリグラム（mg）を、0.1M2-（N-モルホリノ）エクソスルホン酸（MES）（pH 6.5）に対して透析した。塩酸カルシウムを最終濃度1mMとなるように添加した。それから因子V₁/V₂を4mlのアッゲル-15活性化アガロースビーズ（CA州、リッチモンド、バイオラド・ラボラトリーズ社）と混合し、生じた結合反応混合物を、製造業者が推薦するもの（バイオラド）に従って4℃、4時間の回転処理を行った。

固体サポート上の過剰タンパク質結合部位を、その固体サポートを、0.1Mグリシンエチルエステル中、室温で1時間浸漬することにより、ブロックした。その後、この固体サポートを、焼結ガラスロート上各約20mlの①バッファA、②1M NaCl含有バッファA、③5mM EDTA含有バッファA及び④1mM CaCl₂含有バッファAをこの順序で用いて洗浄した。それか

ら過剰の液体を減圧下で脱色、半乾燥状の粒子物質（ケーキ）を作った。

ムロTFの因子Ⅷ／Ⅸ混和性による单離

0.1Mのグリシンエチルエステル及び0.1M MES(pH 6.5)を含む2.0%の溶液を、2.2.5%のアフィゲル-1.5アガロースビーズ（バイオラド）と混合し、結合反応混合物を作る。この結合反応混合物を空温に1時間維持する。この生成した結合物を、洗浄ガラスロート上、10倍容のバッファ1を用い、減圧下では過ることにより洗浄し、グリシンエチルエステルーアガロースケーキを作る。

例1で調製した3.0%の脂抽出溶液を、1.0M塩化カルシウムを含む6リットルのバッファAに対し、4℃、1晚透析を行う。透析した脂抽出物を、グリシンエチルエステルーアガロースケーキと混合し、固液相反応混合物を作る。回転しながら室温で2時間維持した後、この固液相を洗浄ガラスロートを用いて流過することで分離する。この液相を回収し、最終濃度まで当り1.0ユニットとなるようにトラシロール（MO州、セントルイス、シグマケミカル社、アプロチニン）と混合する。この回収した液相を例3で調製した因子Ⅷ／Ⅸ／アガロースケーキと混合し、第2の固／液相混合物を作る。

この混合物を回転しながら、一晩4℃に維持し、ムロTF-因子Ⅷ／Ⅸ含有固相物を形成させる。その後、この固相及び液相を先に述べたように透過により分離する。洗浄ガラスロート上に残留する固相を1.0M塩化カルシウムを含むバッファA 2.5%で洗浄した。さらに、この固相を洗浄ガラスクロマトグラフィーカラム（0.5×1.5cm、バイオラド）に移し、6.0%の同洗浄バッファで洗浄した。上記の洗浄後、この固体サポートに結合

ムロTFを、1.0分の1容のTF 8-5G9又はPAb100（ATCC-TIB115；ここでネガティブコントロールとして用いられているSV40ラージT抗原特異的抗体を生産するハイブリドーマ）ハイブリドーマ培養上清とともに、4℃で1晩インキュベートすることにより免疫沈殿を行った。アガロースビーズ（MO州、セントルイス、シグマ・ケミカル社）上に固定したヤギの抗マウスIgGを、その第1次免疫反応産物を吸収するのに用いた。このビーズを同バッファでよく洗浄し、結合した¹²⁵I-ムロTFを、DTT存在下又は非存在下、同バッファ中で5分間煮沸することにより溶出した。SDS-PAGE後、タンパク質バンドはオートフルオログラフィーで可視化した。

单離したムロTFを放射性ヨウ素化し、DTTで還元し、ついで10%アクリルアミドゲルでSDS-PAGE分析したとき、47kDルトンの見かけの分子量をもつ單一のメインバンドが観察された（第4図）。しかし、未還元のムロTFを同様に分析した場合は、およそ5.8及び47kDaの2つのバンドが相対的に等しい量で観察され（第5図レーンB）、このことは、少なくとも2つの異なる多様さのものの存在を示している。

非還元で観察されるこの2つのバンドに対する説明としては、その大きな方、すなわち、泳動が遅いバンドは、非常に多くのグリコシル化を受けたものか、付加的なプロセッシングを受けていないタンパク質を有しているのか、又は、付加的な、ジスルフィド結合で結合したポリペプチドと結合しているのかもしれないというものである。還元後の單一バンドの存在は、はじめの2つの示唆と一致している。その後者の可能性は中でも一番大きいようと思えるが、その小さいサイズの差のために、付加的ポリペプチド鎖は、色素の場所又はその付近に泳動するような十分小さいも

したムロTFを、洗浄ガラスカラム上に保持されている固体サポートを5.0MのEDTAを含むバッファAで洗浄することにより、遊離（溶出）させる。溶出した物質を1.0%酸分づつ回収し、各回収について、例2で述べた方法により、ムロTFの存否を検定した。ムロTF含有百分率を算め、4℃で、1%トリ Triton X-100を含む6リットルのTBS（1.50M NaCl、1.50Mトリス塩酸、pH 7.5）に対して1晚透析した。

このようにして作った透析物をつづいて、4倍容の冷アセトンと混合し、ムロTFタンパク質を沈殿した。この沈殿をおよそ-10℃、5000×g、30分間の遠心で氷めた。生成したペレットを茎素封筒気下で乾燥した。典型的な収量は、脱脂した脂組織粉末1グラム（乾燥重量）当り、2.8gのムロTFであった。

このようにして生じた单離ムロTFサンプルをTBS/トリトン中に懸濁し、ついで、製造業者の指示に従がい（1L、ロックフォード、ピアス・ケミカル社）、コードゲンを用い、No.1001でラベル化した（1L州、アーリントンハイツ、アマーシャム社、マイクログラム当り1.6マイクロキューリ）。ラベル化後、透析の末反応¹²⁵IをTBS/トリトンを用いたセファデックスG25（N.J. ピスカタウイ、ファルマシア社）での脱塩クロマトグラフィーにより、ラベル化したムロTFから分離した。

¹²⁵Iラベル化ムロTF含有サンプルのラウリル硫酸ナトリウム-ボリアクリルアミドゲル電気泳動による（SDS-PAGE）評価は、レムリ（Laemmli）（ネイチャー（Nature）、227巻、680～685頁（1970年））の方法に従った。還元条件下で評価するサンプルに対しては、1.00Mのジチオスレイトールを、サンプルバッファ中に合させた。1%トリ Triton X-100、5.0Mトリス塩酸（pH 7.4）、1.50M NaCl中の¹²⁵I

のらしく、還元後、1.0%アクリルアミドでは分離されないのである。1.5%のボリアクリルアミドゲルの還元及び非還元ムロTFの電気泳動は、單一の分離した粗類を示すには失敗したが、いくつかの少量の、遅く泳動するバンドが観察された（第5図、レーンA及びB）。これらの小さい、少量のボリペプチドは、以前に報告されているように（ブローズ（Broze）等、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー（J. Biol. Chem.）、260巻：10817～20頁（1985年）及びグレハ（Geha）等、ブロシーディング・イン・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス（Proc. Natl. Acad. Sci.）USA、83巻、299～302頁（1986年））、汚染物を示している。この可能性を明らかにするため、47kDa及び5.8kDaのバンドは非還元ゲルから切り出され、その各々を、ジチオスレイトールで還元し、その各々を、1.5%アクリルアミドゲルを用いたSDS-PAGEにかけた（第5図、レーンC及びD）。5.8kDaタンパク質は1.25kDa粗類及び47kDa粗類であると分った。47kDaのタンパク質を分離したとき、同分子量の粗類のみが観察された。このように、両者は、SDS-PAGEで同様の挙動をもつ粗類を保有していた。

直接粗類の存在を示すため、¹²⁵I-ムロTFを、ムロTF特異的モノクローナル抗体TF 8-5G9で免疫沈殿し、それを還元剤存在下の電気泳動にかけた。主要な47kDaバンドがおよそ、12.5kDaの分離したバンドとともに観察された（第6図、レーンA）。還元化しないサンプルの電気泳動でおよそ47kDa及び5.8kDaのバンドを生じたが、低い分子量のボリペプチドは生じなかった（第6図、レーンB）。また非還元ムロTFの電気泳動は、ブローズ（Broze）等（ジャーナル・オブ・バイオ

特表平1-503438 (18)

ロジカル・ケミストリー(*J. Biol. Chem.*)、260巻: i0917 ~ 20頁(1985年)により示唆されているトロトF重複のダイマーと一致する、少量の90kDaタンパク質も示した。

トロトF重複が重複からタンパク質の分離によって生ずるという可能性を研究するため、SDS-PAGEにより重複した軽鎖及び重鎖を、N末端アミノ酸配列分析にかけた。

重鎖及び軽鎖をSDS-PAGEで分離し、アバーソールド(Abersold)等の高pH法(*J. Biol. Chem.*)、261巻、4225~4238頁(1986年)を用い、活性化した、アミノ酸残基アミノ酸残基ガラスフィルター上に電気プロットした。このタンパク質バンドを、蛍光染料(アバーソールド(Abersold)等、上記)により、このプロットを可視化し、切り出し、そして、まだファイバーガラスに結合したまま、PTC誘導体のオム・ラインHPLC分析を用いたアブライド・バイオシステムズ470Aタンパク質シーケンサーで配列決定した。別にタンパク質バンドをコマージ・ブルーによる染色によりゲルを可視化し、シーケンシングのために、電気溶出した。両方法とも等しい結果を与えた。

トロトF重複のマイクロシーケンシングは、ほぼ等モル量のアミノ酸配列で一致した結果となった。ほとんど全ての場合、各アミノ酸残基は2サイクル離れて、2度出現する。これは、長さがN末端で2残基異なるトロトF重複の2つのパリアントがねじれたN末端をもつことの明白な証拠である。大きい方のパリアントのN末端は、非特定のアミノ酸Xを含む

Ser-Gly-X-T-His-Thr-Val-Ala-Ala-Tyr-X-Leu-Thr-Trp-Lys-serであることが証明された。

軽鎖の配列決定するいくつかの試みは、プロックされたN末端

と一致して、なんら配列の情報を与えなかった。しかし、トロトFの重複及び軽鎖は、単離されたトロトFに対して生じた、2つのウサギの抗トロトF抗体液及び28個の、マウスモノクローナル抗体の全てが、重複のみに結合することが分っていることから、抗原的に全く別のものである。それゆえ、軽鎖は、重複のタンパク質分解断片とは考えにくい。さらに軽鎖は、ベーター、ミクログロブリンに対する抗体液とは反応しなかった。

現在、12.5kDaのトロトF重複の意味は知られていない。それは、單一の、独立した分子種なので、ランダムなジスルフィド交換による、単離の際にアーティファクトとして誤算されたものでもないようだ。還元なしに、脱水性による単離を行ったトロトFをSDS-PAGEにかけたとき、トロトF活性は、58kDaと47kDaの分子量に対応するゲルから溶出した。これら2つの分子量に対応するトロトF活性も、粗縫又は部分的に単離した胎盤の抽出物を、SDSゲルの電気泳動にかけたとき(データ示さず)も検出された。全ての場合において、その活性は、因子Ⅷa存続、このことは、トロトF特異的活性を示している。これらの見解は、トロトFのみが因子Ⅷaを活性化でき、かつ、軽鎖はこの機能に必要なことを示している。

軽鎖がトロトF重複のおよそ半分のみにジスルフィド結合していることは興味深い。生体内で、トロトFの重要な領域に不在なのか、存在するのかとは別に、界面活性剤で分解される、非共有的相互作用を介して結合しているのであろう。軽鎖は、サイズが小さく、SDS-PAGEの際にマーク色素の部分に泳動してしまうため、また、トロトFの報告されている分析例が還元後行なわれていることから、初期の研究では気づかれてなかった。現行の脱水性を用いた方法で単離することができる制限された量では、

タンパク質染色によって、結合した小ポリペプチド鎖を検出することは困難である。

イン・ビトロでは、单量体トロトFが凝集を開始するにもかかわらず、トロトFによる凝集の生理的開始は、細胞表面で起こる。軽鎖は、直接的凝集検定法で検出することができる、トロトF活性又は抗体において重要な役割をはたしていることが推察できるであろう。例えば、軽鎖は、因子Ⅷa/Mの組織因子への結合の正の協同性を説明すると仮定されてきている、因子Ⅷaに対する2つのサブユニットレセプターのアッセンブリーに関与している可能性がある。別に、細胞表面面上の精造ドメインでのトロトFの構造及び、細胞表面上でのトロトF活性の制御は、トロトF軽鎖に仲介されるのかもしれない。

N結合オリゴ糖の役割は、***1-トロトFサンプルの脱グリコシル化により破壊した。毎分およそ 3.6×10^3 カウントを含む、ラベル化トロトF約1.274ナノグラムを0.4ニニットのグリコペプチダーゼF(1N州、インディアナボリス、ベーリングラー、マンハイム・バイオケミカルス社)、20mMトリス緩衝(pH7.5)、1.0mM EDTA、及び1%トリトンX-100を含む20μLの溶液と混合し、37℃に16時間維持した。それから、この脱グリコシル化した産物を、先に述べたSDS-PAGEで分析した。

第7図、レーン4及び5に示した、脱グリコシル化の研究結果は、58kDaのトロトFは、別のタンパク質部分、すなわち軽鎖の存在のため、47kDaのものよりも、高い相対分子量を示すことを表わしている。

このようにして単離したトロトFを、再脂質化し、そのプロコアグランツ活性が再構成された。最高の活性を有する再脂質化組

成因子産物を提供するに必要な組織因子: 脂質比が、0.1%BSAを含むHBSバッファ溶液(20mMヘペス、pH6.0、140mM NaCl、0.01%アジ化ナトリウム)中、種々の濃度となるように、上述の得られた単離トロトFを溶かすことにより実験的に測定された。それから、種々トロトF希釈物を以下に述べるように再脂質化し、さらに、例2で報告されている凝集検定法で測定された、最も高い活性を示す比が、後の使用のために準備された。

トロトFの再脂質化のための脂質は、M0卵、セントルイス、シグマケミカル社から入手できるウサギの脳アセトン抽出粉末から抽出することにより調製した。この粉末を、粉末1gに対し、2.5gのヘプタン:ブタノール(2:1、v/v)の割合でヘプタン:ブタノールと混合し、ついでこれに含まれる固体を挑戦ガラスロートを用いた遠心により回収した。残留固体について、この抽出を6回くり返した。さらに、この残留固体をロト・エバボレーションで乾燥し、クロロホルムに溶解後、-80℃で保存した。必要なときに、そのクロロホルムに溶解した固体を窒素露囲気下で乾燥し、厳しく研磨した0.25%のデオキシコール酸ナトリウム溶液中、40g/m2となるよう溶解し、ウサギ脳リン脂質溶液(PBPL)を作った。

再脂質化には、各トロトF希釈物100μLを、100μLのPBPL溶液、0.76μLの1%ウシ血清アルブミンを含むHBS溶液(HBS/BSA)及び40μLの100mM氯化カルシウムと混合する。この混合物を2時間、37℃に維持し、ついで、ここに含まれるトロトF活性を、例2で述べた凝集検定法で測定した。

5. ハイブリドーマ及びモノクローナル抗体の作成

全てのハイブリドーマは、6～8週間の年令の、スクリップス・クリニック・アンド・リサーチ・インスチチュート、動物飼育場から入手できるメスのBalb/cマウス由來の脾細胞を用いて作成された。

a. マウスTF8の免疫化

例4で説明した親和性单離化トロTF5マイクログラムを100μg/mlとなるよう生理食塩水に溶かし、MO州ヘミルトンのリビ・イム・ケム・リサーチ社から入手したR-700アジュvantと1:1の割合で混ぜ、エマルジョン化した。ついで、このエマルジョンをマウスTF8に皮下注射した。

このマウスTF8は同様に、約2週間後、変性トロTF及びR-700アジュvantを含むエマルジョンの接種を受けた。変性トロTFは、0.09%トリトンX-100、0.93%SDS、0.2M-2-メルカプトエタノール及び270μg/mlトロTHを含むTBS(150mM CaCl₂、50mMトリス-HCl(pH 7.5)を、5分間煮沸して調製した。その後、この変性したトロTFを、等容量の、0.6mg/mlマウス血清アルブミンを含む生理食塩水と混合した。ついで、4倍容のアセトンを、この変性トロTF溶液に混ぜ、生じた沈殿物を、一晩、-20℃に保った。生じた沈殿を約13000×g、10分間の遠心で洗浄、4:1(v/v)のアセトン：水で一度洗浄してから、0.1ml/mlの濃度となるよう、200μgの生理食塩水で懸濁した。

最初の注射から、約4週間後、0.1ml生理食塩水中33μgの親和性单離化トロTFを、0.1mlの完全フロント・アジュvant(cPA)と混合し、エマルジョンを作り、これをマウスTF8に腹腔内注射をした。

最初の接種から8週間後、リン酸緩衝食塩水中15μgの親和

ム・バイオケミカルズ)をイムロン・96穴フレキシブル・ビニルマイクロプレートのウェルに入れた。それからこのプレートを、1時間、37℃を維持し、IgGをウェルの壁に吸着させた。TBSで3回洗浄した後、336オバルミンを含む100μgのTBS/トリトンを各ウェルに入れ、過剰のタンパク質結合部位をブロックした。

ウェルを、1時間、約20℃で維持したのち、そのプロッキング液を、アスピレーターで除いた。そして、各ウェルに50μlのハイブリドーマ培養上清を加えた。できた固相免疫反応混合物を1時間、37℃で維持した。その後ウェルをTBSで3回洗浄し、過剰の液は、アスピレーターで除いた。

例4で説明した、TBS/トリトン中、およそ10⁵のトロTFと、およそ5×10⁵cpsを含む、50μlの¹²⁵Iラベル化トロTFを各ウェルに入れ、第2の固相免疫反応混合物を作った。そのウェルをTBS/トリトンで3回洗浄し、固相に結合した¹²⁵I-トロTF含有免疫反応物を単離した。過剰の液体はアスピレーターで除き、ウェルを乾燥させた。個々のウェルを切り離し、各ウェルに含まれる¹²⁵Iを、ガムカウンタで計数した。

バックグラウンド放射活性(トロTFと抗体の反応無しの場合)はウェル当たり、平均約200～300cpsであったが、一方、トロTFと抗体の反応がある場合は、ウェル当たり10000cpsのカウントがある。抗トロTF抗体の生産が正と検定されたハイブリドーマを選択し、本発明のハイブリドーマとした。ついで、これらのハイブリドーマを、以下に述べるドット・プロット検定でスクリーニングした。

b. ドット・プロット・ライザ法

例4で説明した、アセトン沈殿したトロTFを、4:1(v/v)

性单離化トロTFを静脈注射(1. v.)し、同じトロTF/PBS接種を24時間後にも行った。そのマウスTF8の脾細胞を融合のため3日後に採取した。

c. マウスTF8の免疫化

マウスTF8は、2回のリビ・アジュvant注射に、エマルジョン化前に変性したトロTFを用いること以外は、マウスTF8と同じ接種スケジュールがほどこされた。さらに、第1回目のPBS接種の腹腔内注射をCFA含有接種後4ヶ月半後に行なった。

d. ハイブリドーマの作成

TF8及びTF9由來の脾細胞に、同じ融合操作を行った。各マウス由來の脾細胞約1×10⁶個を、30%ボリエチレンガムボール(PEG 4000、ATCC 25322-68-3)を含む200μlの融合媒体中、2×10⁷のP3X63A₂8.653.1ミエローマ細胞と混合した。細胞融合後、生じたハイブリドーマを96穴プレートに植種し、HAT培地(ヒポキサンチン、アミノブテリン、及びチミジン)中で培養し、つづいて、トロTFと反応する抗体分子生産能でスクリーニングした。

両マウスTF8及びTF9脾細胞由來の融合体共、HAT融合媒体耐性ハイブリドーマ細胞クローンを生じた。TF8融合体は907個のHAT耐性ハイブリドーマを、一方TF9融合体は、348個のHAT耐性ハイブリドーマを生じた。

e. 抗トロTF抗体分子の生産によるハイブリドーマのスクリーニング

f. 固相RIA

TBS中、20μg/mlに希釈した100μlのヤギ抗マウスIgG(IN州、インテナボリス、ペーリングー・マンハイ

ム・バイオケミカルズ)をイムロン・96穴フレキシブル・ビニルマイクロプレートのウェルに入れた。それからこのプレートを、1時間、37℃を維持し、IgGをウェルの壁に吸着させた。TBSで3回洗浄した後、336オバルミンを含む100μgのTBS/トリトンを各ウェルに入れ、過剰のタンパク質結合部位をブロックした。このアセトン：水溶液で抽出した。残存する沈殿をTBS中に20μg/mlとなるように溶解した。このトロTF溶液20μg(1μl)を、消えないインクで、BAB3ニトロセルロース紙(シェリーチャー・アンド・シェエル、NH州、キーン)上に書いた数字の間にスポットする。スポットしたトロTFを空気乾燥し、個々のスポットをパンチを用いて、ディスクに切り出す。個々のディスクを、BLotto(ジョンソン)等、ジェネティック・アナリティカル・テクニック(Gene. Anal. Tech.)1巻、3頁(1984年)を含む、多穴トレイの個々のウェルに挿し、約1時間、37℃で維持した。

このBLottoを、ウェルからアスピレーターで除き、各ウェルに、200μlのハイブリドーマ培養上清を加えた。さらにこのウェルを2時間、37℃で維持し、その後、このペーパーディスクを、TBSで2回洗浄し、ウェルから取り出し、TBSにより、さらに洗浄するため、1つの大きな容器に入れた。ついで、過剰の液体をその容器から除去する。

プロトプロット試薬キットの(MI州、アン・アーバー、プロメガバイオテク社)アルカリホスファターゼ結合抗マウスIgGを、BLottoで5700倍に希釈し、このペーパーディスクと接触させた。このプロトプロット溶液との接触を、37℃で30分間保った。その後、ペーパーディスクを、TBS中で3回洗浄した。業者の指示に従い、プロトプロットキット中に含まれている発色物質により、ディスク上に結合したアルカリホスファターゼが検出される。

g. ウエスタン・プロット検定法

ウェスタン・プロット検定のため、例4で報告したように疊層した約10μgのトロTFをサンプルバッファ(2×5DS、

特表平1-503438 (20)

5.0 mMジオステイトル、1.0%グリセリン)に浴かし、5分間、煮沸した。それから、これを、レムリ(Lemli)により報告された(ネイチャー(Nature)、226巻、680頁(1970年))、参考としてここに紹介されている、予め染色された分子量標準の小さい四側のレーンの間に広いレーンに試料をロードする、分取型のスラブゲルを用いたSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけた(分子量標準: MA州、ニュートンセンター、ディバーシティ・バイオテク社)。参考としてここに紹介されている、トウビン(Towbin)等(プロシーディング・イン・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci.) USA, 76巻、4350頁(1979))により報告されているように、電気泳動及びニトロセルロースへの電気プロッティング後、このプロットを、TBS中の5%脱脂粉乳溶液でブロックし、マニホールドに固定した(MA州、ケンブリッジ、イムネクス社、ミニブロック)。8個のハイブリドーマ細胞培養上清のストックを、各マニホールドスロットにロードし、37°Cで1時間インキュベートした後、このプロットを取り除き、TBSで洗浄した(0.02%アジ化ナトリウム含有TBS)。抗体が結合したレーンを、発色物質で発色させたアルカリホスファターゼを結合した第2抗体を用い、供給業者の推める方法に従って可視化した(WI州、マジソン、プロメガバオテク、プロトプロット)。陽性のストック由来の培養上清を、5%脱脂粉乳TBSによる8倍希釈物について、別個に再テストし、抗TF抗体を生成する個々のハイブリドーマローンの肯定を行った。

抗トロTF抗体産生が正と判断されたハイブリドーマをさらに特徴づけるために選択した。例えば、上記のTF8融合体由来のハイブリドーマは、例6で述べられているドット・プロット検

5G9モノクローナル抗体1.0μgの透析により、活性化した。活性化したTF8-5G9を、2×1のアフィゲル-1.0アガロースビーズ(バイオラF)と混合し、できたカップリング反応混合物を、製造業者の指示に従い処理して、TF8-5G9/アガロース固体サポートを作った。

それから、例3で報告したように、固体サポート上の過剰のタンパク質結合部位をブロックし、洗浄後、被圧縮して、TF8-5G9/アガロースケーキを作った。

9. hトロTFの免疫親和性による単離

ヒトの脳のおよそ半分、すなわち約1.0kgに堪しい、例1で調製した脳抽出溶液を、計6LのバッファAに対し、2回の外液交換をしつつ、4°Cで3日間透析した。その透析した抽出物を1.5時間、10,000×gで遠心した。できた上清を、例4で調製したグリシンエチルエステル-アガロースケーキと混合し、固液相反応混合物を作る。回転しながら、2時間室温に維持したのち、その固相と液相を洗浄ガラスロートによる遠心で分離した。そのhトロTF含有液相を回収し、例8で調製したTF8-5G9/アガロースケーキと混合し、固/液相反応混合物を作った。

この免疫反応混合物を、回転しながら一晩、4°Cで保ち、組織因子含有固相免疫反応産物を形成させた。それから、この固相及び液相を先に述べたように透析で分離した。固相が残留し、これを1.0倍容のバッファAで洗浄した。その後、固相をガラスクロマトグラフィーカラムに移し、順次、0.1%トリトンX-100を含む2倍容の1M NaCl、及び0.1%トリトンX-100を含む2倍容の0.1Mグリシン(pH 4.0)で洗った。

上述の洗浄後、その固体サポートに免疫学的に結合しているhトロTF、その固体サポートを、洗浄ガラスロート上に保持した

定法及び例6cで述べられているウェスタンプロット検定法でトロTFとの免疫反応を、そのハイブリドーマ培養上清が示すならば、抗hTF抗体産生ハイブリドーマ培養と特徴づけられる。これらの特徴は、24個のTF9ハイブリドーマ細胞系列についてみられ、そのほとんどは、例1の第5表に示した。その他のスクリーニング法で選択したハイブリドーマにより產生される抗体分子はHAT細胞を独自の結合体に提供する免疫化マウス(すなわちTF8又はTF9)、及び、独特のHAT培養耐性ハイブリドーマ細胞が單離される、96穴培養プレート、列番号及びウェル番号を示す文字によって呼ばれる(すなわち、5B7、11D12、その他)。特殊な意味の文字は、1塙、ハイフン既又は2塙として、ここにリストされる。例えば次の文字は同じモノクローナル抗体分子組成を意味している; TF8-5G9、TF8-5G9及びTF8-5G9。

7. イムノグロブリンIgGの単離

イムノグロブリンIgGは、製造業者の指示に従がい、バイオラドラボラトリーズMAPS IIシステムを用い、マウスのハイブリドーマ細胞系列TF8-5G9(ATCC第HB9382号)を含むマウスの腹水液から単離される。単離したIgGのタンパク質濃度は、製造業者の説明書に従がい、BCAタンパク質検定試験(ピアスケミカル社)を用いて測定した。

8. hトロTFの免疫親和性による単離のための、抗トロTF含有固体サポートの開発

抗トロTF抗体を、アガロース固体マトリックスへカップリングするため、少なくとも1回透析液交換を行う、0.1M MES、pH 6.5を含む500×gの透析バッファに対する、4°C、16時間の、例7で報告したように調製した、MAPS単離TF8-

まま、0.1Mグリシン、pH 2.5及び1%トリトンX-100溶液20×gで洗浄することにより、開放(溶出)した。それから、例4に全て述べたように、溶出物質を回収し、hトロTF検定を行ない、集めて透析した。

透析物を4倍容の冷アセトンと混合し、hトロTFタンパク質を沈殿化した。さらにこの沈殿をおよそ-10°C、5,000×g、30分の遠心で集めた。生成したペレットを窒素雰囲気下で乾燥し、そのペレットの一部を変性条件でのSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析した(SDS-PAGE)。

第8図に示したこの分析結果は、hトロTFが免疫親和性により、脱脂粉末1グラム当り、3.3μgのhトロTFの収率で単離されることを示している。

10. 抗トロTF抗体による凝集の阻害

1.0μgのハイブリドーマ培養上清を、例4で調製した約2gの再生質化hトロTFを含む90μgのHBS/BSAと混合した。このようにして作った免疫反応混合物を30分間37°Cに保ち、抗トロTF抗体分子を免疫学的にhトロTFに結合させ、免疫反応産物を形成させた。ついで、この免疫反応混合物について、例2で述べたように、トロTFのプロコアグラント活性を検定した。ネガティブ・コントロールとして、無関係のIgG調製物を抗トロTF抗体の代りに用いた。

効果的hトロTF濃度は、インヒビターの存在下測定した凝集時間を用い、例2のように作った標準曲線から外挿した。阻害は、用いた実際のhトロTF濃度について、効果的hトロTF濃度の比値として表わされる。少なくとも50%の阻害をするモノクローナル抗体分子調製物は、本発明の抗体分子成分を中和するものとして選択された。

例5に述べたように、单離したトロTFに対して生じたハイブリドーマ由来の数多い培養上清を、凝集開始を阻害する能力について、先の操作により調製した。有意に凝集を阻害することが分ったハイブリドーマを、第5表に示した。

また、抗トロTF抗体による凝集阻害は、予め形成されたトロTF-因子V複合体を用いて行った。例4で調製した再脂質化したトロTF 1.0μgを含む1.0μlを、HBS/BSA 7.0μl、2.0nM脂質化カルシウム1.0μl及び、例3で述べられているように調製した因子約2.5μgを含む1.0μlと混合する。この混合物を1.5分間3.7℃に保ち、トロTFを、混合物として使える因子Vと複合体をつくる。その後、1.0μlの浴液に、例7で述べたように調製したMAPS-单離化モノクローナル抗体約1.0μgを混合し、この第2の混合物を、3.0分間3.7℃に保った。さらに、第1に2.0nM脂質化カルシウム1.0μlを加えて、ヒトのクエン酸化血浆又は例1.2で述べてのように調製した因子V欠損血浆を加え、ついで秒で戻された凝血時間を観測することにより、生成した混合物の凝集阻害の測定を行った。例1.0で述べられているように、阻害率を変わし、予め形成したトロTF-因子V複合体での阻害の結果を、第6表に示した。

第6表

抗トロTFによるトロTア-因子V依存の凝集阻害

1. クエン酸化ヒト血浆による凝集。

抗体	因子V*	阻害率
プランク	+	0
TT85G9*	+	5.8%
コントロール*	+	0
TF85G9	-	8.3%

複合体により開始する凝集を阻害する能力を有能にもつと考えた。これらのMoAbには、TF9-1B8、TF9-5B1、TF8-5C4、TP8-11D12、及びTF8-21F2がある。

1.1. ポリペプチド合成

ここで使用されている種々のトロTF h領域に対応するポリペプチドをハゲンマイヤー(Hagenaeyer)等(ボップーセイラーズ(Hoppe-Seyler's)2、フィジオロジカル・ケミストリー、353巻、1973頁(1982年))のシンメトリカル・アンハイドライド法を用いたアブライド・ペイオシステムズモデル&30Aペプチド合成機で化学合成した。第1及び第2表のポリペプチドに加え、以下に示す第3表のポリペプチドも合成し、これには、トロTF hと反応できる抗ポリペプチド抗体の生産に有用な、本発明のポリペプチドが含まれている。

第3表
抗原性ポリペプチド

1.2. ポリペプチドによる凝集阻害

トロTF依存の凝集開始を遮断する、本発明のポリペプチドの能力を、まず、このポリペプチドを因子V/Vとカルシウムイオン存在下でインキュベーションし、さらにこの混合物を、因子V/Vと欠損血浆に加えて、凝血時間を観測した。

ヒトの因子V/Vを例3に述べた方法で单離した。HBS/BSA 7.0μl及び、この单離した因子V/V 2.0μlの浴液1.0μlに、1.0μl HBS、2.0μl 2.5nM CaCl₂ 及び100

コントロール 0

II. 因子Vテブリート化ヒト血浆

抗体	因子V	阻害率
プランク	+	0
TF85G9	+	5.8%
コントロール	+	0

a. "プランク"とは、モノクローナル抗体を検定法で用いなかったことを示している。

b. "TF85G9"とは、ハイブリドーマTF8-5G9から单離したモノクローナル抗体を検定で用いたことを示している。

c. "コントロール"とは、検定で親属性なモノクローナル抗体を用いたことを示している。

d. "+"は、抗体を混合物に加える前、因子Vを加え、精製したトロTFと複合体を形成させることを示す。

抗トロTF抗体による凝集阻害の別の研究が、TFを因子V/Vと会合させ、TF:因子V/V複合体を形成させる前後の阻害を比較する条件下で行った。

これらの研究で、予め形成したTF:V/V複合体を用いた抗トロTF抗体による凝集阻害を、利用するモノクローナル抗体含有浴液1.0μlにMAPS单離化モノクローナル抗体含有浴液の代りに、ハイブリドーマ培養上清を用いた以外、例1.0で述べたと基本的に同様に行なった。比較のため、抗トロTF抗体による凝集阻害を、例1.0で述べたように、因子V/Vを含むクエン酸化血浆との混合の前、それら抗体及び再脂質化トロTFの免疫複合体を形成することにより検定した。

ここで述べている全ての抗体は、この比較阻害検定試験を行なったが、約6.0%以上の阻害を示すものだけが、トロTF:V/V

との合成ポリペプチド含有TB5/トリトンを加えた。種々の濃度で含まれる多種の混合物をこのように調製し、それを、1.5分間、3.7℃に維持した。例4で述べたように調製した再脂質化した組合因子を、HBS/BSAで希釈し、例2で述べたような凝集検定法でテストしたとき、1.0μlでおよそ4.5秒の凝集時間が得られるように調製した。上記のように維持した混合物をさらに、再脂質化トロTF 1.0μl希釈物、2.5nM CaCl₂ 1.00μl及び1容の血浆に対し1.5容のHBSで希釈した因子V/Vと欠損血浆1.00μl(KA州、オーバーランド・パーク、ジョージ・キング・バイオメティカル社)と混合した。凝血時間の延長は、この合成ポリペプチドによる凝集の阻害を示していることになる。阻害率を、例1.0で述べているように計算した。少なくとも3.0%の凝集阻害を示すポリペプチドはトロTF結合部位ポリペプチド類似物、すなわち：第4表のセクション1で示されているポリペプチド、p26-49、p146-107及びp161-189である。

別に、上記阻害検定において、モノクローナル抗体による免疫親和性吸着により、因子V/V欠損血浆である因子V/Vと欠損血浆を用いた。ヒトの因子V/Vに対するモノクローナル抗体を、例3で述べたように单離した因子V/VをトロTFの代りに免疫原として用いた以外、例5で述べたものと基本的に同様に調製した。できたハイブリドーマを、イライザ法で評価し、IN州、サウスベンド、エンゼイム・リサーチ・ラボラトリーズ社から入手できるヒトの血液タンパク質、タンパク質S、因子IX、因子X及び因子Vと反応しないハイブリドーマを同定した。そのようなハイブリドーマ、FV11、F1、2H3-3.2は、J.S.エジントン(Edington)博士から取いた(CA州、ラジオラ-

特表平1-503438 (22)

スクリップス・クリニック・アンド・リサーチ・ファンデーション社)。イムノグロブリン IgG を、ハイブリドーマ FV11、F1、2H3-3.2 を含むマウスの腹水から単離し、この単離した IgG を、例 8 に述べたように、固体サポートに結合させた。できた抗因子 V/Va モノクローナル抗体含有固体サポートを貯留した正常なクエン酸化血漿から、血漿含有液相を吸着し、保留すること以外、例 9 で述べた免疫親和性操作を用いて、因子 V/Va を除くのに用いた。

脂質化型で用いたとき、競合的に窒素を阻害する、いくつかのポリペプチドの能力を、100μM の合成ポリペプチド溶液の代りに、100μM の脂質化合成ポリペプチドを用いることにより上記検定法での評価を行った。

脂質化合成ペプチドは、合成ポリペプチドを、単離した h u T F の代りに用いること以外は、単離した h u T F の再脂質化で用いた、例 4 で述べた方法で調製した。ルーチンには脂質とポリペプチドの比は 5:2:1 (w/w) が用いられた。少なくとも 30% の窒素阻害を起こす脂質化ポリペプチドが、脂質化型で存在するとき、h u T F 結合部位ポリペプチド類似物すなわち、第 4 段のセクション II で示されたポリペプチドと考えた。

第 4 表

h u T F のポリペプチド類似物の
h u T F による窒素開始の阻害

ペプチド	阻害	濃度
I. 脂質化合成ペプチド		
p 1 - 3 0	2 5 0	1 0 μM
p 2 6 - 4 9	8 8 8	1 0 μM
p 4 1 - 7 1	2 5 0	1 0 μM

た。

50μM のハイブリドーマ培養上清を各ウェルに入れ、1 時間 37℃ で維持した。さらにこのウェルを TBS で 3 回洗浄し、過剰の液体をアスピレーターで除いた。

单離化 h u T F は、例 9 で述べたように、免疫親和性カラムで調製した。单離化 h u T F を含むアセトン沈殿を TBS / トリトン X に溶かし、そのタンパク質濃度を、製造業者の説明書に従がい、BCA タンパク質検定試薬 (ピアス) を用いて測定した。h u T F の炭化水素側鎖を、オシャネシー (O'shaughnessy) 等の報告した方法 (イムノロジカル・レターズ (Immunol. Letters), 8 卷、273-227 頁 (1984 年)) に従がい、ビオチン-ヒドログリド (NY 州、ブレインビュー、ICN バイオメディカル社) を用いて、ビオチン化し、ビオチン化 h u T F 溶液を作った。

TBS / トリトン中 50μM のビオチン化 h u T F 溶液を、5 μM 合成ポリペプチドとともに、各ウェルに入れ、1 時間、37℃ で維持した。その後、このウェルを TBS / トリトンで 3 回洗浄した。

5 mM EDTA、0.5% トリトン X-100 及び 1% BSA を含む TBS で 1/100 に希釈した、100μM のストレプトアビシン-結合アルカリホスファターゼ (NY 州、ニューヨーク、エンゼバイオケム社、デテクター sk) を各ウェルに入れ、30 分間、37℃ で維持した。その後、このウェルを、1.0 mM リン酸カリウム (pH 6.5)、2% BSA、0.5% トリトン X-100、0.5 M 塩酸ナトリウム及び 1 mM EDTA を含む溶液を 4 回洗い、ついで検出バッファ (0.1 M トリス・塩酸 (pH 8.8)、0.1 M NaCl、5 mM MgCl₂) で 1 度洗った。

その後、検出バッファ中、2 mM の 2-ニトロフェニルリン酸

p 4 0 - 4 9	2 5 0	1 0 μM
p 5 6 - 7 1	2 5 0	1 0 μM
p 7 2 - 1 0 4	2 5 0	1 0 μM
p 9 4 - 1 2 3	2 0 0	1 0 μM
p 1 2 1 - 1 5 5	1 0 0	1 0 μM
p 1 4 6 - 1 6 7	8 7 5	1 0 μM
p 1 6 1 - 1 8 9	3 2 5	1 0 μM
p 1 9 0 - 2 0 9	2 0 0	1 0 μM
p 2 0 4 - 2 2 5	2 0 0	1 0 μM
なし	0	-

II. リン脂質化ペプチド

p 1 - 3 0	8 1 0	1 0 μM
p 2 6 - 4 0	8 3 0	1 0 μM
p 4 0 - 7 1	6 5 0	1 0 μM
p 5 0 - 7 1	7 3 3	3 0 μM
p 8 4 - 1 2 3	9 2 7	1 0 μM
p 1 2 1 - 1 5 5	5 5 0	1 0 μM
p 1 4 6 - 1 6 7	8 0 0	1 0 μM
p 1 6 1 - 1 8 9	9 4 0	1 0 μM

III. 例 1-2 で述べたように測定した阻害率

上記のポリペプチド阻害研究で得られた代表的投与-応答曲線を第 9 及び第 10 図に示した。

IV. ポリペプチドによる抗体-h u T F 免疫反応の阻害

フレキシブルビニルでできたイムロン U 底 9'6 穴プレート (グリナテク社) のウェルを過剰タンパク質結合部位のプロッキングを、37℃ 20 分間行うこと以外、例 6 で述べた方法でナギ抗マウス IgG (ベーリングガーマンハイム社) によりコーティングし

を含む溶液 100μM を各ウェルに加え、1 時間 37℃ に維持する。ついで、405 ナノメーターでの光学密度を各ウェルについて、バイオ・テク・マイクロプレートリーダー (VTEC、ウィンスク、バイオ・テク・インスツルメント) を用いて測定した。

この競合的阻害研究の結果を第 5 表に示した。

第 5 表

モノクローナル抗体とペプチドの相互作用の表

Bad*	p 1 p 2 8 p 4 0 p 4 1 p 5 6 p 7 2 p 9 4 p 1 2 1 p 1 4 6 p 1 5 1 p 1 9 0
	-30 -49 -71 -49 -71 -104 -123 -155 -167 -189 -209
TF85C9	+
TF811D12	+
TF85C4	+
TF821P2	+
TF91D5	+
TF92C4	+
TF92F6	+
TF95C7	+
TF96B4	+
TF99C3	+
TF910C2	+
TF81F1	+
TF91E7	+
TF91B8	+
TF91B9	+
TF94D11	+
TF95G4	+
TF95B7	+
TF96G4	+

特表平1-503438(23)

TF97E10	+	+
TF98E8	+	+
TF99E1	+	+
TF99E4	+	+
TF96CB ^a	+	+
TF91DH5 ^b	+	+
TF99DS ^c	+	+
TF910H10 ^d	+	+

a. 各モノクローナル抗体 (hb) は、同名のハイブリドーマにより産生された。全てのハイブリドーマは例13で述べたように、ハイブリドーマ培養物上清を用いてスクリーニングした。

b. これらの抗体は、例10の結果から中和性をもたないと考えた; その他の全ての抗体は、同結果に従がい中和性をもつと考えた。

もし、オリベプチド存在下で得られた蛍光度測定値が、オリベプチド非存在下で与えられた抗体に対して得られた平均値から1以上の標準偏差をもつとき、回答が有意に起ったと考えた。

14. 2部位イライザ法による身体サンプルにおける抗トロトF検出

血液、血漿、唾液、尿、その他の身体サンプル中の抗トロトFは、同じ抗トロトF分子に同時に結合することができる2つのモノクローナル抗体を用いて検出できる。

イムロン・ポリスチレンU底9.6穴プレートを、まず、各ウェルに、TBS中10μg/mlに希釈したIgG100μg/mlを入れ、ついで、ウェルと、IgG溶液との接触を、4℃、一晩維持することにより、ヤギ抗マウスIgG (ベーリンガーマンハイム社)でコートした。そのウェルを、TBSで3回洗浄し、ついで、

が抗トロトFに同時に結合できる能力をもつ限り、いろいろ試験ができる。例えば、第1抗体として、TF9-1D12を、TF9-10H10の代りに、第2の抗体として用いることができる。このように、本発明は、本検定法で同時に結合できる種々の抗体の組合せを考証した。

15. 全プレトロトFコード配列を含むDNA断片の構築

全プレトロトFコード配列を含むDNA断片を第11図にその制限地図に示されている。組換えプラスミドpCTF64、pCTF603及びpCTF314と、この分野でよく知られている操作を用いて構築することができる。例えば、マニアチス(maniatis)等、NY州、コールドスプリングハーバー、モレキュラー・ラボラトリ、ラボラトリーマニュアル、モレキュラー・クローニング(1983年)参照。

第11図で示されている組換えDNAプラスミド中に含まれる挿入断片は、クローニングを可能にする、各末端のEcoRIリシンカ-5'-GGAAATTCC-3' (MA州、レキシントン、コラボラチブリサーチ社)を有している。これらのリシンカ-配列は、天然の抗トロトF DNAコード配列の一部ではないので、第2図に示されるスクレオチド配列中には存在しない。組換えDNA分子構成の説明は、図示する抗トロトF DNA配列についても明らかのように、EcoRI末端を含む消化により生じ、これらの付加的なリシンカ-配列を含む断片は、第2図で示したスクレオチド塩基番号によって示されるだろう。この断片は、その末端にこれら付加的配列を含むことが理解できよう。

プラスミドpCTF64を、制限エンドスクレアーゼEcoRI及びDraIIで消化し、第2図で示される、塩基番号1~296番に対応するスクレオチド配列を含むDNA断片を作った。このよ

各ウェルに、SMBSAを含むTBS/トリトン100μlを加えた。その後、これらのウェルを1時間、37℃で維持してから、TBSで3回洗浄し、さらに、過剰の液体をアスピレーターで除いた。

第1のハイブリドーマ、TF9-6B4由来の抗トロトF抗体分子含有培養上清100μlを各ウェルに入れ、1時間37℃で維持した。それから、これらのウェルをTBSで3回洗浄し、ついで過剰の液体を、アスピレーターで除いた。

例9で説明したように、先駆親和性処理し、アセトントリル化トロトFを、TBS/トリトンに溶した。このトロトF溶液の希釈物をTBS/トリトンで5μl/mlから0.5μg/mlの範囲で調整し、希釈液100μlをイムロンプレートのウェルに入れた。このトロトF希釈液を、第1の抗体と接触させ、1時間37℃で維持した。さらにこの希釈物をウェルから吸出し、ウェルをTBS/トリトンで3回洗浄した。過剰の液体をアスピレーターで除いた。

抗トロトF抗体を、例7で述べた方法により、第2のハイブリドーマTF9-10H10の腹水からMAPSで単離した。この抗体溶液のタンパク質を測定し、ついで、例13で述べたようにビオチン化によりラベル化した。

このビオチン化した抗トロトF抗体をTBS/トリトンで60μg/mlに希釈し、この溶液100μlを各ウェルに入れた。そのウェルを1時間、37℃で維持し、ついでTBS/トリトンで3回洗った。

この結合した、ビオチン化抗トロトF抗体を、例13で述べたデテクター-alkシステムを用いて検出した。この検定法で第1及び第2の抗体として用いているモノクローナル抗体は、その2つ

うにして作った、302スクレオチド塩基対(bp)断片をアガロースゲルを用いたサイズ分離により単離し、アルカリホスファターゼを用いた処理により脱リン酸化した。

プラスミドpCTF403を制限エンドスクレアーゼEcoRIで消化し、第2図の残基776~1125番に対応するスクレオチド配列を含むDNA断片を作った。生成した352bpの断片を、アガロースゲルを用いたサイズ分離により単離した。

プラスミドpCTF314を、制限エンドスクレアーゼEcoRIで消化し、生成した647bpの断片をサイズ分離で単離した。この断片は、第2図の残基135~775番の配列に対応するスクレオチド配列を含んでいる。647bp断片をサイズ分離し、アルカリホスファターゼで脱リン酸化した。

この352bp断片及び脱リン酸化した647bp断片をT4DNAリガーゼの反応によって機能的に結合(ライゲーション)し、第2図の残基135~1125番に対応するスクレオチド配列を有する999bpの断片を作った。

さらに、この999bp断片を、制限エンドスクレアーゼDraIIで消化し、第2図の残基296と297番の間でこの999bp断片を切断し、これによって、158bpと831bpの断片が生ずる。さらに脱リン酸化した302bpの断片と、831bpの断片をT4DNAリガーゼで機能的に結合し、第2図の1~1125番に対応するスクレオチド配列を含む1125bp断片を作った。

EcoRIで消化して、クローニングプラスミドベクター-pUC8を線状にした。先に調製した1133bp断片と、EcoRI消化したベクターをT4DNAリガーゼで機能的に結合して環状組換えDNA分子pUC-プレトロトFを作った。

大陽園RR1株(MD州、ゲイザーズバーグ、ベセスダ・リサ

特表平1-503438(24)

ーナラボラトリーズ) を pUC-C-Phe-TPh でトランスポー
ムし、そしてアンビシリント性に亘づいて、トランスポーマントを選択した。それから、この選択したトランスポーマントをクロ
ーン化し、Phe-TPh 携造遺伝子をもつ組換え DNA 分子の存在によりスクリーニングした。

Phe-TPh 携造遺伝子をもつ組換え DNA 分子の存在によるスクリーニングは、各選択されたトランスポーマント由来の rDNA を EcoRI で消化することによって行った。生じた EcoRI 断片をアガロースゲルでサイズに従って分離した。352 bp, 781 bp 及び 2682 bp の DNA 断片に対応する三つのバンドパターンを示す組換え DNA 分子で Phe-TPh 携造遺伝子の存在を確認した。上述の EcoRI 消化パターンを生ずる rDNA を有する大腸菌 RR1 トランスポーマントは、本発明の組換え DNA 分子を含み、かつ、選択され(回収)された。

細胞外アンカー領域を含むが、カルボキシル末端にトランスメチレン・アンカー領域を欠く、Phe-TPh コード配列の実質的領域を含み、従って、可溶性 Phe-TPh タンパク質をコードする DNA 断片を次のように構築した。

プラスミド pCTP64 を制限エンドヌクレアーゼ EcoRI で消化し、第2図の 1~486 番の残基に対応するヌクレオチド配列を含む DNA 断片を作った。このようにしてできた 486 bp の断片を、アガロースゲルを用いたサイズ分離で単離し、その後、アルカリホスファターゼ処理で脱リン酸化した。つぎに、このように脱リン酸化した 486 bp の断片を制限エンドヌクレアーゼ DnaB を用いて消化し、第2図の 296 番と 297 番の間の部位で、486 bp 断片を切断し、296 bp 及び 190 bp の断片とした。この 296 bp の断片をアガロースゲルのサイズ分離で単離した。

(1983 年) の方法に従がい、互いにオリゴヌクレオチドが機能的に結合するのを防ぐため、ボリヌクレオチドキナーゼによりリン酸化を行なわれなかったこと以外は同様にして、

5'-ATTTAGAGAATAAGAATTCCGG-3'

3'-ATCTCTTATTCCTTAAGCCCC-5'

の配列をもつ、合成オリゴヌクレオチドアグリマー断片を作った。このオリゴヌクレオチドをアニールし、粘着 EcoRI 末端を含む二本鎖 DNA リンカーダー断片を作り、ローダースタイン(Rothestein)の方法(メソッズ・イン・エンデイモロジー(Botheda In Enzymol.)、58巻、98頁(1979年))に従って、平滑末端とした。つぎに、このリンカーダー断片を、pUC-C-Phe-TPh-T から得た 775 bp 断片に機能的に結合し、775 bp 断片の各末端に 1 つのアニール断片を含む 817 bp 断片を作った。その後、この 817 bp 断片を EcoRI で消化し、817 bp 断片の各末端を平滑から EcoRI 粘着末端へと転換し、805 bp 断片とした。この 805 bp 断片をアガロースゲルを用いたサイズ分離で単離した。

クローニングプラスミドベクター pUC18 を EcoRI で消化し線状化した。先に調製した 805 bp 断片と EcoRI 消化したベクターを T4 DNA リガーゼを用いて機能的に結合し、環状組換え DNA 分子 pUC-C-Phe-TPh-T-R とした。

大腸菌 RR1 を pUC-C-Phe-TPh-T-R でトランスポームし、pUC-C-Phe-TPh-T-R を含むクローネである、アンビシリント性トランスポーマントを選択した。

16. 組換え tRNA コード配列の発現に反応 tRNA の生産
組換え DNA 分子由来の組換え tRNA の発現は原核性細菌細胞、非脊椎真核性細胞及びより高等な(脊椎) 真核性細胞を含

プラスミド pCTP314 を制限エンドヌクレアーゼ EcoRI で消化し、第2図の 135~775 番の残基に対応するヌクレオチド配列を含む DNA 断片を作った。この 641 bp 断片をアガロースゲルを用いたサイズ分離で単離し、ついで、アルカリホスファターゼ処理により脱リン酸化した 641 bp 断片を、DnaB で消化し、第2図の 296 番及び 297 番の間の部位で、この 641 bp 断片を切断し、これにより、162 bp 及び 479 bp の断片とした。このうち、479 bp 断片をアガロースゲルを用いたサイズ分離により単離した。

上述のように調製した 296 bp 及び 479 bp の断片を、T4 DNA リガーゼを用いた反応により機能的に結合(ライゲーション)し、第2図の 1 番から 775 番の配列に対応するヌクレオチドアグリマー配列を有する 775 bp 断片を作った。

クローニングプラスミドベクター pUC18 を EcoRI による消化で線状化する。上記のように調製した 775 bp 断片と、EcoRI 消化ベクターを T4 DNA リガーゼで機能的に結合し、環状組換え DNA 分子 pUC-C-Phe-TPh-T-R を作った。

大腸菌 RR1 を、pUC-C-Phe-TPh-T-R でトランスポームし、pUC-C-Phe-TPh-T-R を含むクローネであるアンビシリント性トランスポーマントを選択した。

組換え DNA 分子 pUC-C-Phe-TPh-T-R を EcoRI で消化し、生成した 775 bp 断片をサイズ分離で単離した。

カルバザース(Carbazole)等(ジャーナル・オブ・アメリカン・ケミカル・ソサイアティー(J. Am. Chem. Soc.)、103巻、3185頁(1981年))及びゲイト(Gait)等(コールド・スプリング・ハーバー・シンポジウム・オブ・バイオロジー(Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.)47巻、393

頁)の発現媒体中で行うことができる。そのような発現媒体の代表例には、各々、大腸菌 S. cerevisiae (ceresvisiae) 及びチャイニーズハムスター肝臓(CHO)細胞がある。

• 大腸菌における Phe-TPh の発現

大腸菌において、Phe-TPh 携造遺伝子を発現できる組換え DNA 分子は、例 15 で作った pUC-C-Phe-TPh 携造 DNA 分子由来の Phe-TPh 遺伝子含有 DNA 断片を単離し、ついで、この断片を原核性発現ベクターに機能的に結合することにより構築することができる。

組換え DNA 分子 pUC-C-Phe-TPh を、そのプラスミド中に存在する EcoRI 部位を部分的に切断するような条件で、EcoRI 消化する。この部分消化法は、ニアアチス(NiaA)等、NY州、コールドスプリング・ハーバー、コールドスプリング・ハーバー・ラボラトリーズ、ラボラトリーマニュアル、モレキュラー・クローニングにより詳細に報告されている。図 2 の残基 1 番から、1125 番で示される配列に対応するヌクレオチド配列を含む 1133 bp 断片を、サイズ分離により EcoRI 部分分解産物から単離した。

原核性発現ベクター pKK223-3 (NJ 州、ビスカタウェイ、ファルマシア・ファイン・ケミカルズ社) 及び EcoRI による消化で線状化した。この消化ベクター及び 1133 bp Phe-TPh 携造遺伝子含有断片を T4 DNA リガーゼを用いて機能的に結合し、環状組換え DNA 分子 pKK-C-Phe-TPh を作った。

大腸菌 RR1 を pKK-C-Phe-TPh でトランスポームし、pKK-C-Phe-TPh 含有クローネとしてアンビシリント性トランスポーマントを選択した。

特表平1-503438(25)

b. 大腸菌における λ uTF λ の発現

大腸菌において λ uTF λ 遺伝子を発現することができる組換えDNA分子は、例1-6-2で調製した1133bp断片を操作して構築した。まずこの断片をアルカリホスファターゼで脱リン酸化し、ついで、制限エンドヌクレアーゼBbvIで消化した。生じた964bpの断片は、第2回の残基164~1125番に対応するスクレオチド配列を含んでおり、サイズ分離により単離した。

先に述べたように、

及び

の配列をもつ合成オリゴスクレオチドアグリマー断片を作り、ロザーステイン (Rotherstein) 等 (メソッズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymol.) 68巻、98頁 (1979年)) の方法に従って、粘着EcoRI及びBbvI末端を含む二本鎖DNAリンカーダー断片をアニーリングすることにより作った。このリンカーダーをまず964bp断片に機能的に結合して、1008bp断片とした。ついで、1008bp断片を、T4DNAリガーゼを用い、EcoRI消化したベクターpKK223-3と機能的に結合し、環状組換えDNA分子pKK-huTF λ を作った。

組換えDNA分子pKK-huTF λ は、pKK-ブレhuTF λ と、山野基1~129番の残基がない、及び凹折しいメオニンコドンが、残基130番の前に機能的に結合しており、その結果タンパク質発現 (翻訳) が挿入されたメオニンコドンの場所で始まることが異なる。

組換えDNA分子pKK-ブレhuTF λ 及びpKE-huTF λ を、その中に含まれる構造遺伝子によりコードされるhuTF λ を、

又はブレhuTF λ の発現に適合する原核性宿主細胞に導入した。そのような宿主細胞の代表例は、大腸菌RR1株である。この宿主を、組換えDNA分子でトランスフォームし、細胞増殖とこの組換えDNAの発現に適合する条件下で培養し、この発現したタンパク質を従来の技術を用いて収穫した。

c. CHO細胞におけるブレhuTF λ の発現

脊椎動物細胞中、ブレhuTF λ 遺伝子を発現できる組換えDNA分子を例1-6-2で調製した1133bp断片を用いて構築した。

カルバーザス (Carbomas) 等及びゲイト (Galt) 等の方法 (上記) を用い、



の配列をもつ合成オリゴスクレオチドアグリマー断片を作った。ついでこのオリゴスクレオチドアグリマー断片を、ロザースティン (Rotherstein) 等の方法 (メソッズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymol.) 68巻、98頁 (1979年)) を用い、1133bp断片の各末端に結合し、元々1133bp断片に存在するEcoRI粘着末端を、BbvI粘着末端に転換した。

真核性シミアンウイルス (SV40) を基本とする発現ベクター、pKSV-10 (NJ、ピスカタウェイ、ファルマシア・ファイン・ケミカルズ社) を、制限エンドヌクレアーゼBbvIによる消化で線状化した。1133bpのBbvI適合断片及び、BbvI消化ベクターを、T4DNAリガーゼを用いて、機能的に結合し、環状組換えDNA分子pSV-ブレhuTF λ を作った。

大腸菌RR1を、pSV-ブレhuTF λ でトランスフォームし、アンビシリン耐性のトランスポーマントを選択し、クローン化し

た。それからこの選択したトランスポーマントをクローン化し、モノクローナル抗体TF8-5G9を用いて、発現するブレhuTF λ タンパク質の存在を各クローンについて検定して、pSV-ブレhuTF λ の存在に関する選択を行った。

d. CHO細胞におけるhuTF λ の発現

小鼠類細胞において、huTF λ を発現することができる組換えDNA分子を、例1-6-2由来のpSV-ブレhuTF λ を、制限エンドヌクレアーゼBbvIで消化することにより構築した。生成した1153bp断片をサイズ分離し、ついで、制限エンドヌクレアーゼBbvIで消化した。生じた974bp断片は、図2の残基164~1125番の配列に対応するスクレオチド配列を含み、これを、サイズ分離により単離した。

先に述べた方法で、

及び

の配列をもつ合成オリゴスクレオチドアグリマー断片を合成し、アニールして、粘着性BbvI及びBbvI末端を含む二本鎖DNAリンカーダー断片を作った。ついで、このリンカーダーをT4DNAリガーゼを用いて974bp断片に機能的に結合して、第2回の残基130~1125番の残基の配列に対応するスクレオチド配列を含む、1018bp断片を作った。

プラスミド発現ベクターpKSV-10を、BbvIで消化して線状とし、ついで、T4DNAリガーゼを用いて、1018bp断片に機能的に結合し、環状組換えDNA分子pSV-huTF λ を作った。

組換えDNA分子pSV-ブレhuTF λ 及びpSV-huTF λ

を、内在する構造遺伝子によりコードされるhuTF λ 又はブレhuTF λ タンパク質の発現するのに適合した真核性宿主細胞中に導入した。このような媒体を含む宿主細胞の代表例には、CHO細胞がある。

宿主を、組換えDNA分子でトランスフェクトし、安定なトランスポーマントを選択法で選択した。例えば、グラハム (Graham) 等、ビロジー (Virol.) 、52巻、456頁 (1973年) 及びサウザーン (Southern) 等、ジャーナル・オブ・モレキュラー・アンド・アプライド・ジェネティクス (J. Mol. Appl. Genet.) 1巻、327~341頁 (1982年) 参照。トランスポーマントした宿主細胞を、細胞増殖及びその組換えDNA発現に適合した条件下で培養し、発現したタンパク質を、従来法により収穫した。

e. イーストにおけるブレhuTF λ の発現

f. セレビシニア (cerevisiae) において、ブレhuTF λ 遺伝子を発現できる組換えDNA分子を、先に述べたように、



の配列をもつオリゴスクレオチドアグリマー断片を合成し、ついで例1-6-2の1133bp断片の末端に、それを結合することにより接続した。このようにして作ったアグリマー化した断片は、C₁I粘着末端をもつ。

イーストの発現ベクター、pTD1 (アメリカン・タイプ・ティッシュコレクション、#ATCC31255) を、制限エンドヌクレアーゼC₁Iでの消化により線状化した。上記のC₁Iアグリマー化1133bp断片及びC₁I消化ベクターを、T4DNAリガーゼを用いて、機能的に結合し、環状の組換えDNA

特表平1-503438(26)

分子 pY-ブレ h u T F h を作った。

大腸菌 R R I をブレ h u T F h でトランスポームし、ブレ h u T F h 構造遺伝子を発現するトランスポーマントを、例 16 で述べた方法により同定及び選択を行った。

1. イーストにおける h u T F h の発現

S. セレビシアエ (*cervisiae*) において、h u T F h 構造遺伝子を発現できる組換え DNA 分子を、pY-ブレ h u T F h の C I a 1 による消化により、第 2 図の残基 1 ~ 1 1 2 5 番の配列に対応するスクレオチド配列を含む 1 1 5 1 bp 断片を作ることで構築した。サイズ分画による単離後、1 1 5 1 bp 断片を B b v 1 で消化し、第 2 図の残基 1 6 4 ~ 1 1 2 5 番の配列に対応するスクレオチド配列を含む 9 7 8 bp 断片を作った。この 9 7 8 bp 断片は、サイズ分画により単離した。

及び

の配列をもつ合成ポリスクレオチドアダプター断片を作り、先に述べたように、アニールすることで、C I a 1 及び B b v 1 粘着末端をもつ DNA アダプターを作った。まず、このアダプター断片を、9 7 8 bp 断片に規則的に結合することにより、1 0 2 0 bp 断片とした。つづいて、この 1 0 2 0 bp 断片を、T 4 DNA リガーゼを用い、例 1 6 ～ 1 で述べられているように調製した C I a 1 消化 p T D T 1 ベクターと結合し、環状組換え DNA 分子 pY-h u T F h を作った。

組換え DNA 分子 pY-ブレ h u T F h 及び pY-h u T F h を、内在する構造遺伝子によりコードされる h u T F h 又はブレ h u T F h タンパク質の発現に適合するイースト宿主媒体中に導入した。

17. ポリペプチド p 2 4 - 3 5 及び p 1 5 9 - 1 6 9 による凝集 因客

第 7 図にそのアミノ酸残基配列を示した例 1 1 で述べたように合成した。

第 7 図

ペプチド名	アミノ酸残基配列
p 2 4 - 3 5	E-SHEPKPVNQVYT-ON
p 1 5 9 - 1 6 9	E-IYIILYYWISSSSGKTKAK-ON

●、各ポリペプチド実験名は、第 1 図に含まれているアミノ酸残基配列を表わしている。

それから、ポリペプチド p 2 4 - 3 5 及び p 1 5 9 - 1 6 9について、例 1 2 で述べられているように、h u T F による凝集開始を競合的に阻害する能力を検定した。この研究の結果を第 1 2 図に示し、p 2 4 - 3 5 及び p 1 5 9 - 1 6 9 は、1.0 μM 濃度で用いたとき、各々、h u T F で開始した凝集を、4.5% 及び 2.5% 因客できることを示している。この研究において、第 1 2 図で白丸により示したこれらペプチドに対する因客パックグランドは、第 4 図で示した実験結果よりも低いことに注意しなければならない。結果として、この研究において、1.0 μM 濃度での凝集因客を少なくとも 2.0% 起こすポリペプチドは、h u T F 結合部位ポリペプチド類似物と考えた。

従って、ポリペプチド p 2 4 - 3 5 及び p 1 5 9 - 1 6 9 は本発明の h u T F h ポリペプチド結合部位類似物を示している。また、ポリペプチド p 2 5 - 4 9 で得られた同様の結果を考慮すると、p 2 4 - 3 5 で得られた結果は、h u T F h - 因子 VI / VI a 結合部位は、これら 2 つのポリペプチドの共通部分、すなわち、

入した。このような様体を含む宿主細胞の代表例には、S. セレビシアエ (*cervisiae*) 細胞がある。

宿主細胞を、この組換え DNA 分子でトランスポームし、選択培地で培養して、従来法により、トランスポームした細胞を単離した。例えば、ハイネン (Hynes) 等プロシーディング・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci.) USA, 75 卷、1929 頁 (1978 年) 及び、ミヤジマ (Miyajima) 等、モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー (Mol. Cell. Biol.) 4 卷、407 頁 (1984 年) 参照。トランスポームした細胞を、細胞増殖及び組換え DNA 発現に適合する条件下で培養し、ついでこの発現したタンパク質を従来法で収穫した。

8. 組換え h u T F h コード配列の発現による可溶性 h u T F h の生産

組換え DNA 分子からの可溶性 h u T F h の発現は、ブレ h u T F h 及び h u T F h に対し、例 1 6 ～ 1 で述べたと同様に、種々の発現媒体で行なわれた。その例において、EcoR 1 粘着末端を有する断片を含む 1 1 3 3 bp のブレ h u T F h 構造遺伝子の例 1 6 ～ 1 の作成と、つづいて、例 1 5 b ～ 1 での操作で、大腸菌、S. セレビシアエ (*cervisiae*) 及び CHO 細胞の 3 種の発現媒体において、ブレ h u T F h 又は h u T F h を発現できるベクターを作った。同様に、EcoR 1 粘着末端を有する可溶性ブレ h u T F h 構造遺伝子を含み、例 1 6 ～ 1 で調製した 8 0 5 bp の断片を例 1 6 b ～ 1 で述べた方法で從がって操作し、これら同発現媒体中可溶性ブレ h u T F h 又は h u T F h を発現できる発現ベクター (すなわち、ブレ h u T F h - TR 又は h u T F h - TR) を作った。

第 1 図で示した残基 3 0 - 3 5 、(-VNQVYTY-) のアミノ酸残基配列で作られていることを示していることに注目すべきである。

18. 抗 h u T F 抗体による凝集因客の速度論

抗 h u T F 抗体が、h u T F の凝集開始を因客できる時間を測定するため、この因客の時間経過を、例 1 0 で述べた因客検定法を用いて測定した。

例 7 で述べたように調製した、MAPS 再酵化 T P B - 5 G 9 モノクローナル抗体およそ 1 ng を、1.00 μL H B S / T B S 中、例 4 で述べたように調製した再酵化 h u T F およそ 1 ng と混合した。このように形成した種々の混合物を、3.7℃ で、約 1 から 60 分の間の種々の時間維持し、抗 h u T F 抗体を、h u T F と免疫学的に結合させ、免疫反応産物を作った。第 1 3 図で示した時間に、各混合物について、例 2 で述べたように、h u T F の凝血活性を検定し、ついで、例 1 0 で述べたように凝集率を示した。

第 1 3 図で、このような速度論的測定の結果は、この検定で用いた抗体及び精製した h u T F の濃度で、6.5% 以上の h u T F による凝集開始の因客が、1.0 分以内に起こることを示すことが分る。より高い抗 h u T F 抗体濃度では、より速く、完全な凝集が起こると考えられる。

19. 抗 h u T F 抗体による、h u T F による凝集開始因客の投与 - 因客

抗体投与範囲にわたる、h u T F 凝集開始を因客する本発明の抗 h u T F 抗体の能力は、次の修正をした例で述べた方法により検定した。例 4 で調製した再酵化 h u T F 1 ng を、0.1 μL の H B S / B S A 中、例 7 で述べたように単離した、種々の量の

特表平1-503438(27)

TF8-5G9モノクローナル抗体と混合した。このように調製した混合物を維持して免疫反応産物を作り、つづいて例10で述べたように、ヒトTFの基質活性に関する検定を行った。

そのような投与-応答検定の結果を、第14図に示し、また、このことはこの研究で用いたヒトTF濃度に対し、 \pm 2当り、およそ1~5ngの抗ヒトTFでの最高値の半分の阻害を示している。

同様の投与-応答実験を、ヒトTF源として溶解したヒト細胞を用いて行った。

ヒトの線維芽細胞系列GM1381(NIGMSヒューマン・ジェネチック・ミュータント・セル・レポジトリ)を、2mMグルタミン、5%ウシ胎児活性及び抗生素質を補った、ダブル修正イーグル培地(DMEM、NY州、グランドアイランド、ギブコラボラトリ)中、37°Cで、7%(\pm /v)二酸化炭素空気共通気下で培養した。GM1381細胞を増殖し、そして収穫し、さらに 30×10^6 個の細胞のペレットを遠心で調整し、-70°Cで凍結した。この凍結ペレットをHNバッファ(2.5mMヘペス、140mM NaCl \cdot 、pH7.0)中の1.5mMベータ、オクテルグルコビラノシド溶液9μlを加えて急速に融解し、さらに10分間37°Cで維持して、細胞を溶解した後、HN1B \cdot を加えて、細胞溶解物を作った。

例17で述べたように単離したモノクローナル抗体TF8-5G9を、第15図に示した種々の投与に対し、0.01%BSA(シグマ、R1A級)で希釈した。それから各抗体希釈物2.5μlに、先に調製した細胞溶解物22.5μlを加え、50分間37°Cで保って、抗体を細胞溶解物中に存在するヒトTFと免疫反応させ、免疫反応産物を形成させた。その後、2.5mM CoCl \cdot

50μMを、免疫反応産物を含む溶液50μlと混合し、ついで、50μlのクエン酸化ヒト血漿と混合し、凝固を開始させた。このようにして作った混合物を37°Cに維持し、血漿の熱加と、凝血形成の間の時間を測定した。効果的ヒトTF濃度及び阻害率を例10に述べたように計算した。

ヒトTF源として、ヒトGM1381細胞溶解物を用いた投与-応答阻害検定からの結果を、第15図に示した。これらの結果は、TF8-5G9抗体が \pm 2当り、およそ8~10ngの抗体濃度でヒトTFのこの細胞溶解液の半分の阻害を起こしたこと示している。

2. 非ヒト組織因子とM.Abの交差反応性

組織因子セ、脛組織(ラット、ラビット、子ウシ、イス、牛、豚及びヒヒ)又は、組織培養細胞(アフリカモドリザル腎臓(COS)細胞)から単離した。組織又は細胞を融解し、膜をはぎ、ミンチし、組織1g当り、1mlの冷アセトン中でホモジネートし、ついで、遠心下、ワットマンガルペーパーで過濾した。この固体をアセトンに懸濁し、もう3回過濾し、一晩空気乾燥したのち、-30°Cで保存した。開始濃度量の1.6~1.9%を含むアセトン粉末を細かくしてから、5.0μl/L EDTAを含むTBS中、5%(\pm /v)となるよう溶解し、空温で1時間混合した。10,000×g、20°C、30分間の遠心で固体を沈め、ついでTF含有層を100,000×g、1時間の上清の遠心で沈めた。このペレットを、TBSに懸濁し、-80°Cに保存した。

動物TF(TF活性をもつ粗組織抽出物)による抗体阻害を、次のように測定した。等容量のTF(1mg/ \pm 2)及びハイブリドーム上清(TBS/BSAでの10倍希釈物)を、37°Cで2時間インキュベートした。残存するTF活性を、そのインキュベ

ーション混合物100μlを、50μlのヒト因子VII欠損血漿及び50μlの50mM CaCl \cdot に添加することにより測定した。37°C、1分後、相同種の血漿の10倍希釈物50μlを因子VII源として加え、凝血形成時間を2度測定した。

24種のM.Abのうちの18個がパブーン様TF又は、アフリカ・モドリザル腎臓細胞抽出物のプロコアグラン特活性を阻害した(第8表)。しかし、M.Abのいずれも、ラット、ウサギ、子ウシ、イス、牛又は豚のTPと、交差反応を示さなかった。すなわち、相同的因子VII源の存在下、ヒト因子VII欠損血漿のリカルシフィケーション時間促進能を示すTF調型物ではなかった。抗体のいずれも、正常なヒト血漿での検定による、ウサギTFのコアグラン特活性を示さなかった。

NoAb	タイプ	RIA ^a (cpm)	Tット チャレンジ		阻害率 ^b R-NB 凝血 ^c VII ^d の阻害	動物 の阻害
			プロット	R		
TF8-5C4	IgG1, κ	6242	+	+	95	57
TF8-5G9	IgG1, κ	28587	+	-	99	80
TF8-11D12	IgG1, κ	29453	+	+	99	82
TF9-1F1	IgG1, κ	25133	+	+	95	83
TF9-1D5	IgG1, κ	3872	+	+	95	76
TF9-1B7	IgG1, κ	28585	+	+	97	90
TF9-1B8	IgG1, κ	28552	+	+	98	83
TF9-1B9	IgG1, κ	28523	+	+	97	84
TF9-2C4	IgG1, κ	24435	+	+	97	78
TF9-2F5	IgG1, κ	27422	+	+	97	79
TF9-4D11	IgG1, κ	25994	+	+	97	81
TF9-5G4	IgG1, κ	24073	+	+	97	83
TF9-5B7	IgG1, κ	25819	+	+	97	74
TF9-5C7	IgG1, κ	24543	+	+	95	72
TF9-6B4	IgG1, κ	17894	+	+	96	98*
TF9-6G4	IgG1, κ	24065	+	+	95	78
TF9-6C9	IgG1, κ	8054	+	+	95	47
TF9-7E10	IgG1, κ	8025	+	+	97	54
TF9-8E3	IgG1, κ	29152	+	+	97	76
TF9-9E1	IgG1, κ	18169	+	+	90	71
TF9-9C3	IgG1, κ	30222	+	+	97	82
TF9-9B4	IgG1, κ	33728	+	+	95	82
TF9-10C2	IgG1, κ	28692	+	+	98	71
TF9-10B10	IgG1, κ	24585	+	+	0	20*
PAb100	IgG1, κ	1929	-	-	0	0*

特表平1-503438(28)

第9表

モノクローナル抗体TF8-5G9による、種々の細胞及び組織の凝血活性の阻害

TF活性源	TF活性 (%阻害)	抗体なし PAb100	TF8-5G9
精製ヒト脳TF	1569	1520 (3%)	245 (84%)
粗脳抽出物	2059	2059 (0%)	411 (80%)
粗脳質抽出物	1287	1344 (0%)	159 (88%)
CH138I細胞芽細胞(溶解化)	990	966 (2%)	143 (86%)
ヒト臍球(溶解化)	2893	2745 (5%)	176 (94%)
J82膀胱がん細胞(溶解化)	882	902 (0%)	93 (89%)
ウサギのトロンボプラスチン	2106	2108 (0%)	2157 (0%)

- 精製したヒト脳TFによって標準されるヒト血清の凝血活性を阻害するとき、文字がその後の場所に入れられている。
- 種々のヒト細胞及び組織により発現される凝血活性の阻害をM・Ab TF8-5G9を用いて詳細に試験した。TF8-5G9は、 $1\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ のときの90%以上、精製芽細胞質化したヒトTFの機能を中和する(第16図)。ヒトの胎盤溶解物及び粗組織抽出物の凝血活性を阻害する、このM・Abの能力も示されている(第9表)。 $10\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ の $1\text{ }\mu\text{g}$ 濃度でのTF8-5G9は、粗胚及び胎盤のアセトン粉末及び溶解したヒトの線維芽細胞、膀胱がん細胞及び内毒素活性化末梢血液単核細胞の凝血活性の80%以上を定量的に阻害する。
- 精製したヒト脳TFを、テスト前にリビロトビヒクルに再構成した。
- 右の2つの例は、指示されている精製IgGで処理した後測定した、ミリユニットで表わした残存TF活性の2回の平均値が示されている。残存するTF活性の測定前、サンプルを37℃で20分間、 $10\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ のIgGとインキュベートした。カッコ内の値は、抗体なしの同サンプル活性ユニットに対する阻害率が示されている。

21. 因子V结合の研究

因子V/V₂のTFへの結合は、機能性TF:V/V₂複合体によるものであるので、因子V/V₂のTFに対する結合を妨げることによる、第8表に示したM・AbのTF活性中和能がテストされた。

ヒトの組織因子仲介による、因子VのJ82の膀胱がん細胞表面への結合はよく調べられている。フェア(Fair)等、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.)、262巻、11692(1987年)。従って、細胞表面 hTF:V/V₂複合体結合に関するM・Abの効果は、J82細胞を、抗体とブレインキューべートし、さらに、 ^{125}I -因子V/V₂の特異的結合を定量することにより試験した。

J82細胞を12穴培養プレート中、フェア(Fair)等によつて報告されているように(上述)、無密度化するまで培養し、バッファA(137mM NaCl、4mM KCl、11mM)、L-グルコース、5mMアジ化ナトリウム、10mMヘペス、pH7.45)で洗浄し、ついで、精製したM・Ab IgG又は、ハイブリドーマ培養上清10倍稀釈物を含むバッファA0.7mlとともに、37℃で2時間インキュベートした。塩化カルシウム及び、 ^{125}I -因子V/V₂を各々、最終濃度5mM及び1nMとなるよう添加し、さらに37℃、2時間インキュベートした。その後、細胞单層を、冷バッファB(140mM NaCl、0.5%BSA、5mMトリスHCl、pH7.45)で5回洗浄し、1mlの0.2M NaOH、1mM SDS、1mM EDTA溶被中で溶解し、その溶解物のタンマ液をカウントした。特異的結合は(非ラベル因子V/V₂を100倍過剰存在下、細胞と会合する ^{125}I 因子V/V₂)、非特異的結合放射活性を差し引いて測定した。特異的結合の阻害率は9容のバッファAと、1容の培養培地で処理したコントロール細胞に対する、M・Abで処理したJ82細胞という形で測定した。

因子V/V₂がTFに結合したとき、それはうまく取り込まれないが、抗体結合によるアインターナリゼーションの可能性を除くため、J82細胞を、5mMアジ化ナトリウムで代謝的に毒殺した。細胞のアジド処理の有無にかかわらず同じ結果が得られ

た。

この研究の結果は、上の第8表に示されている。TF活性を阻害する全ての23個のM・Abは、因子V/V₂結合も阻害した。予想されるように、TF活性を阻害しないM・Ab、TF9-10H10は、因子Vの結合を阻害しなかった。

22. J82細胞による因子X₂形成の阻害

J82細胞上のhTF:V/V₂複合体による因子X₂形成速度を、次の修正をした、フェア(Fair)等(ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.)、262巻、11692頁(1987年))により報告された、多穴培養プレート検定法を用い2度測定した。細胞を、12穴プレート中で培養し、J82細胞への因子V/V₂結合の際に上述したように、検定開始前、種々の濃度の精製した、M・Abの $1\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ と $37\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ となるよう添加した後、5、10、15分の間隔で、50μlの上清を採取し、550μlの50mMトリス-HCl、225mM NaCl、50mM EDTA(pH8.2)の溶被中に入れた。発色性因子X₂基質添加後(TX社、ビューモント、ヘレナラバ社、3.4mM S-2222 50μl)、速度論的分析モジュールをつけたベックマンDU-30分光器で405nmの吸光度の増加を測定することにより、因子X₂の活性を定量した。因子V/V₂非存在下でインキュベートしたJ82細胞上清のS-2222加水分解によるバックグラウンドを各測定値から差引いた。抗体処理の阻害率は抗体とのブレインキューーションなしの細胞に対して計算した。

M・Ab TF9-2C6及びTF9-5B7によるJ82細胞

の処理に対する阻害曲線は、因子X₁形成速度が、因子VII結合を阻害したものと同様の抗体濃度で阻害されることを示している(第17図)。非阻害的(非中和性)MoAb TF9-10H10はIgG濃度1.0μg/mlまで、凝血促進活性、因子VII/VIII結合又は因子X₁生成速度にはほとんど影響を与えないし、また、コントロールMoAb PAb 100は全く効果がない(データ示さず)。

23. h u T F b ポリペプチドの因子VII/VIIIへの競合的結合による、J82細胞上の因子X活性化の阻害

当分野ではよく知られているように、凝血促進プロテアーゼカスケードの細胞活性化は、消費性血栓出血症と呼ばれる種々の病気と関連している。一般に、凝血促進プロテアーゼカスケードは、膜レセプター及び基本的共因子、組織因子(TF)に対する因子VII/VIIIの高い親和性による発見により、細胞表面で開始する。TF及び因子VII/VIIIの二分子凝血促進複合体(TF:VII/VIII)は、最終的にトロンビン形成及びフィブリンの析出につながる既定したタンパク質分解による因子X及びIIの活性化を起こす。さらに、凝血におけるTFの役割、TFによる凝集プロテアーゼカスケードの開始は、推進性血管内凝固及びトロンボジネシスと関連する。ニーメツ(Kienitz)等、ブラッド(Blood)42巻、47頁(1973年)及びベビラクタ(Bevilacqua)等、ジャーナル・オブ・エクスペリメンタル・メディシン(J. Exp. Med.)、160巻、618頁(1984年)。TFは、炎症性仲介物に対する応答及び細胞免疫応答で、単球及び内皮細胞の表面で発現する重要なエフェクター分子である。

本発明のh u T F b ポリペプチドが、因子VII/VIIIに結合し、それにより、因子Xを活性化することができる、TF:VII/VIII

複合体の形成を阻害する能力を研究した。

TBS中、1.00nMのh u T F b ポリペプチド標識物を含む溶液50マイクロリットル(μL)を、96穴平底ポリスチレン検定プレートの各ウェル96個に入れ、ついでその各ウェルに、例8で述べたように单離した、TBS中1.0nMの濃度に調整した因子VII/VIIIを含む溶液2.5μLを加え、さらに、TBS中2.0nMの塩化カルシウム2.5μLを加え、その混合物を30分間室温に維持した。

ヒト膀胱がん細胞J82細胞を、アメリカン・タイプ・カルチャーコレクション(ATCC HTB1:MD州、ロックビル)から入手し、参考としてここに組込まれているフェア(Fair)等の方法(ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー)、262巻、11692-11698頁(1987年)に従って培養した。

5μLのTBSに5×10⁴個のJ82細胞を懸濁し、上述の維持を行った後、ポリスチレン検定プレートの各ウェルに入れた。その後、ただちに、フェア(Fair)等の報告のように(上述)单離した、TBS中1.00nMの濃度の因子X 2.5μM及び、X₁発色基質S-2222(1mM/TBS)5.0μLを加え混合し、その混合物を2分間室温に維持して、発色反応産物を含む溶液とした。

生成した発色産物量を、V-max 96穴スペクトロホトメータ(カリヨルニア、マウンテン・ビュー、モレキュラー・デバイス社)を用い、405ナノメーター(nm)での光学密度(O.D.)を測定して定量した。ポリペプチドの代りにTBSを用いるか、又は、因子VII無添加のコントロールも測定し最高及び最低O.D.値を決定した。これら阻害の測定結果を第10表に示す。

第10表
h u T F b ポリペプチドを用いたJ82細胞に関するX活性化の阻害

h u T F b ポリペプチド	光学密度*
PBS	0.960±0.033
因子VII/VIIIなし	0.005±0.001
p 1-18	1.007±0.037
p 1-30	1.098±0.028
p 11-28	0.637±0.011
p 24-35	0.477±0.017
p 26-49	0.437±0.020
p 40-71	0.814±0.053
p 72-104	0.781±0.047
p 94-123	0.818±0.055
p 121-155	0.889±0.067
p 144-159	0.507±0.053
p 146-167	0.004±0.001
p 157-169	0.389±0.035
p 161-190	0.600±0.023
p 190-209	0.625±0.031
p 204-226	0.715±0.042
p 244-253	0.619±0.047

1.もし、光学密度(O.D.)が約0.500以下なら、因子Xの活性化の阻害是有意であると考えた。

本研究の結果は、h u T F b ポリペプチド p 24-35, p 26-49, p 144-159, p 146-167 及び p 157-169 は、因子VII/VIIIに結合し、因子Xを活性化できる。TF:VII/VIII複合体の形成を阻害することを示している。これらの

結果は、本発明のh u T F b 複合体が凝集を阻害するのに用いることができるることを示している。

24. 抗 h u T F b MoAb による凝集の生体内での阻害

しひしば、グラム陰性細菌による敗血症は、最終的に死に至らしめるショック状態を起こす。このヘモスタチックシステムの乱れは、このショック状態の展開と密接に関係している。ティラー(Taylor)等(ジャーナル・オブ・クリニカル・インベスティゲーション(J. Clin. Invest.) 79巻、918~925頁(1987年))は、外的に加えられた活性化した、タンパク質C、天然の抗凝血酵素、は、凝集応答及びヒビにおけるLD₅₀の大腸菌濃度の致命的効果を妨害する。

本発明の抗凝血MoAbの生体内における凝集阻害能力を、ティラー(Taylor)等(上述)によって報じられた敗血ショックのヒビモデルを用いて試験してみた。重さを計った7~8のヒビを実験前一晩絶食し、実験の朝、ケタミン(筋肉注射、14mg/kg)で免疫化した。ついで、ペントバルビタール酸ナトリウムを、経皮カテーテルを通して、頭の静脈に投与し、軽いレベルの外科的麻酔状態を維持した(約4.5分毎2mg/kg)。大鼠部静脈を無菌的に穿刺させ、血液採取の為一方の後足にカニュールを差込んだ。経皮カテーテルは大腸菌及び別20で示した、MoAb TF9-5B7を含む試剤を与え、ヒビのTFと交差反応させるのに用了。30分間の平衡化時間の後、この動物に約10分間にわたって、MoAb TF9-5B7 500μg/kg又は1.5μg/kg(例7で述べたように单離し、ついで無菌生理食塩水に透析し、0.58μg/mlの濃度としたもの)又は、無菌のMoAb 500μg/kgを与えた。

MoAb 投与及び30分間の平衡化の後、各動物は、LD₅₀。

特表平1-503438 (30)

の大鼠腹の投与を受けた（約10¹⁰個、投与後約8～15時間で致死性ショックのため死をもたらす量である）。大鼠腹は2時間に渡り注入により投与した。この研究結果を第11表に示す。

第11表

ヒヒの致死性ショックによる致死の生体内における固定

グループ	NoAb	投与 μg/kg	凝血	大鼠腹 注入	死
I. フント-B	TF9-5B7	500	Normal	No	No
II. フント-B	B12	500	Normal	Yes	Yes
III. 実験	TF9-5B7	500	Normal	Yes	No
	TF9-5B7	150	Normal	Yes	No

1. 血圧、凝血活性化及びフィブリリン分解産物を含む種々のヘモスタチスパラメーターは、M o Ab 投与後、大鼠腹注入前に測定した。

2. HBは、TF9-5B7と同じ既知のアントボンのM o Abであるが、無因標の抗原と免疫反応を起こす。

第11表にみられるとおり、M o Ab TF9-5B7を受けたヒヒは LD₅₀ の大鼠腹の投与に対しても生存しつづけた。NoAb 150 μg/kg 及び 500 μg/kg の両投与で保護された。さらに、コアグロバーサーと関係する、顯著な低血圧、凝血カスケード活性化およびフィブリリンの分解は、M o Ab TF9-5B7を受けた動物で著しく緩和された。

25. ヘモグロビン・アルファ鎖としての、58 kDa huTFへテロダイマー絆鎖の特徴

免疫吸収したTFをさらにウェスタン・プロット分析で特性を調べ、58 kDa huTFへテロダイマーの成分、すなわち、例4で述べた47 kDa 及び125 kDa タンパク質を同定した。

なるという結論を支持している。

従って、現在、例4で述べられている58 kDa ヘテロダイマーの125 kDa 絆鎖成分は、ヘモグロビンのアルファ鎖であり、47 kDa huTFタンパク質との結合は、huTF単離操作のアーティファクトであると考えられている。

例1～25の結果のまとめと討議

2つの異なる細胞融合体由来の、ヒト脳TFに対する、24種のM o Ab ライブライターについて報じられている。各M o Ab の免疫特異性は、ドットプロット、ウェスタンプロット及びラジオイムノアッセイにより特徴づけられた。ほとんどのM o Ab は、全ての3条件下、ヒトの本来のTF及び変性TFと反応した。M o Ab の1つ、TF8-5G9は、TFタンパク質のルーチンな精製にうまく使用することができる。それは組織抽出物由來のTF活性を殺害し、ミリグラム量の精製ヒトTFを一定して与える。

M o Ab の1つ以外の全ては、精製したヒト脳TFの機能活性を強く中和する。いくつかのM o Ab は、ヒヒ及びサルのTFと交叉反応をすることが分っているが、相同期因子Xの存在下、ラット、ウサギ、子ウシ、イス、羊、又はブタのトロンボプラスチンにより開始した因子VIIa凝固ヒト血清の凝集を、どの抗体も阻害しなかった。さらに、ウサギ脳トロンボプラスチンによる正常なヒト血清の凝集開始は、どの抗体によっても阻害を受けず、このことは、ヒトTF凝血活性の阻害は、因子V/Vaを含む、可溶性血浆凝血タンパク質への抗体の妨害によるものではないという結論を支持する。

抗TFによるTF凝血活性の阻害に対する最も明解な原因是、因子V/Va結合のブロックである。予想されるとおり、全部で

例5.cで述べたように行った、ウェスタンプロット分析を、電気泳動するサンプルとして、例9で述べたように調製した、免疫吸収により单離したhuTF、精製したヒトヘモグロビン、又は、分子量標準を用いて行った。指示されているところではジスルフィド結合の還元のため、サンプルバッファの中に50 mMジオオスレイトールを含めた。ウェスタンプロットを、非免疫化ウサギ IgG、従来の方法で調製したウサギ抗huTF IgG又は、ダコ（Daco）（カリオルニア、サンタバーバラ）社から入手したウサギ抗ヒトヘモグロビン IgG を用いて、示されているように免疫反応した。最初の2つの IgG 調製物は、例7で述べたように单離したMAPS-Iである。

上で述べたウェスタンプロット分析の結果は、第11図に示した。抗huTF IgGは、還元型huTFの47 kDa のバンドとのみ免疫反応を起こし、125 kDa のバンドとは反応しなかつたが（バネルA、レーン3）、一方、同IgGは、非還元型huTFの58 kDa 及び47 kDa の両バンドと免疫反応を起こした（バネルA、レーン4）；これらの結果は、58 kDa ヘテロダイマーの47 kDa 成分としてのhuTFの同定と一致している。抗体モグロビン IgGは、非還元型huTFサンプル中の58 kDa バンドとのみ免疫反応を起こし、47 kDa のモノマーとは反応しなかつた（バネルB、レーン4）。しかし、抗ヘモグロビン IgGは、還元型のhuTFサンプル中の125 kDa バンドと免疫反応し（バネルB、レーン3）また、125 kDa の精製したヒトヘモグロビン・タンパク質と免疫反応した（バネルB、レーン2）。非免疫ウサギ IgGとの反応はなかった。

上記の結果は、非還元型huTFの58 kDa の分子は、ジスルフィド結合でヘモグロビンと結合した47 kDa huTFから

23個の抗凝血（中和性）M o Ab は、TFの基本的レセプター機能と一致して、J82細胞への因子V/Vaの特異的結合を妨ぐ。さらに、このことは、因子V/Va結合及び、因子V/Va形成速度の阻害のハーフ・マキシマルが同じ IgG 濃度のときに起こる、選択した精製M o Ab の投与濃度においても実証される。

ヒトTFに対するM o Ab は、最近、カーソン（Carson）等（プラッド（Blood）、70巻、490頁（1987年））により、これを直接試験したのではないが、因子V/Va結合の妨害によることは明白に、TF活性を阻害するものであると報じられた。24個のここで述べられているM o Ab のうちの23個が、TF活性を強く中和するという知見は注目に値する。種のヒト凝血タンパク質に対するM o Ab を用いた当出席者の研究室で行った実験は、少數の割合のものが機能活性を中和するというものである。基本的TFとの交差反応性が全く、反応性が各々異なることから、ハイブリドーマ全てが兄弟グローンであるとは思えない。さらに、進行中のエピトープマッピング研究は、この種のM o Ab に少なくとも3つの別の非結合抗体結合部位が確認されることを示している。それゆえ、TFに対するM o Ab を中和する大部分のものは、機能にも関係するわずかな免疫的に優れたエピトープによるものでもないらしい；事實、ホップ（Hopp）等により（モレキュラー・イムノロジー（Mol. Immunol.）20巻、483頁（1983年））TFのアミノ酸配列は、多くの抗原活性基を含んでいることが報告されている。

小さいサイズのTFは、なぜ、そんなに多くの抗TF M o Ab が因子V/Va結合をブロックするのかを部分的に説明している。TFは、cDNAクローニングにより、グルコシル化を除いて、25 kDa の細胞外ドメインをもつことが予想されている。それ

特表平1-503438(31)

ゆえ抗体及び因子Ⅷc分子は、より小さいTFの細胞外ドメインへの結合に立体障害を示すことになる。この立体障害仮説は、TF上の炭化水素鎖がおそらく機能には必要ないことから（ナカムラ（ Nakamura ）、トロンボヘモスクチス（ Tron, Remoist. ） 58巻、135頁（1987年））、コンカナバリーノAはTF活性を阻害する（ピトリック（ Pritch ）ジャーナル・オブ・クリニカル・インベステゲーション（ J. Clin. Invest. ） 55巻、175頁（1975年））という観察と一致する。

それは、種々の細胞及び組織により発現した因子Ⅷc依存凝血活性は、同様の機能をもつ、1つ以上の分子種に原因するということに、いくらか関連している。しかし、M.A. TF 8-5G9は粗脳及び胎盤抽出物及び溶解した雄性膀胱細胞、膀胱がん細胞及び末梢単核細胞の凝血活性を定量的に阻害する。完全ではないが、これらの結果は、現にTFに寄因する細胞性凝血活性は、同一ではないときも抗原的に関連しているという結論を支持している。このことは、TFに対する唯一の遺伝子がおそらく存在しているという知見と一致している。

最近、敗血性ショックの致死効果は、凝血プロテアーゼ CASCADEにおいて、中間段階での役割を果している抗凝血タンパク質、活性化したタンパク質Cを注入することにより、ヒトにおいて防ぐことができる事が示されている。本研究は、TF活性を阻害するM.A.bは、凝血プロテアーゼ CASCADEの開始のブロックにより、それらが、血管内凝血の病理学的活性化と通常関連している、血栓凝血因子の消費を防ぐので、生体内で、非常に特異性の高い抗凝血剤であることを示している。

例4で述べた58kDa型のヒトTFは47kDaのTFタンパク質と、現在では免疫化学的にまだ部分的なアミノ酸配列により、

ヘモグロビンのアルファ鎖と同定されている、およそ12.5kDaのポリペプチドの、ジスルフィド結合で結合しているヘテロダイマーであることが示されている。58kDaのヘテロダイマーが、单離の途中で形成されているらしいので、58kDaのバンドは、天然の細胞性TFのヘテロダイマー型であるという以前の推察は誤りであるだろう。

ヘモグロビンのアルファ鎖は、1つのシスティンをもち、またTFは、cDNAから、その細胞質ドメインに1つのシスティンを有することが予想される。またTFは、細胞外ドメインには4個のシスティンをもつが、TF機能が還元により失なわれることから、少なくとも2つが膜内ジスルフィド結合に使われているはずである。TFの細胞質ドメイン中の1つのシスティンは、ほとんどの細胞質グルタミン酸中のシスティンのように、還元型で維持されているだろう。この（TFの他のシスティンは、ありそうもない）システィンは、細胞溶解後、混合ジスルフィド形成のため容易にアクセスでき、そして、单離操作間での酸化で、TFの細胞質及びヘモグロビンのシスティン間でジスルフィド結合が形成すると提唱される。この結論は、ヘテロダイマー形成は、明らかに時間依存性があり、抗アセトン粉未由来のTFの界面活性剤抽出と、免疫親和性マトリックスへの結合との間の時間を小さくすることが、得られるヘテロダイマーTF量を減少させる概念を支持する。推定される9.6kDaのTFダイマーも、单離の際同様のメカニズムで形成するであろう。

抗ヘモグロビン抗体カラムは、3つの58kDaのヘテロダイマーを特異的に結合したが、免疫親和性で精製したTF調製物中に検索できる高分子量全てを定量的に防ぐことはなかった。

47kDa以上の分子量をもつ他の痕跡量のマイナーバンドは、

-30	-20	-10	
ME	TPAWPRVPRP	ETAVARTILL	GNVFAQVAGA
10	20	30	40
SGTTNTVAAY	NLTWKSTNPK	TILEWEPKPV	NQVYTVQIST
50	60	70	80
KSGDWXSKCF	YTTDTECDLT	DEIVKDVKQT	YLARVPSYPA
90	100	110	120
GNVESTGSA	EPLYENSPEP	TPYLETNLQ	PTIQSFHQVG
130	140	150	160
TKVNNTVVEDE	RTLVRNNNTF	LSLRDVFGKD	LIYTLYYWKS
170	180	190	200
SSSGKKTAKT	NTNEFLIDVD	KGENYCFSVQ	AVIPSRTVNR
210	220	230	240
KSTDSPVECM	GQEXGEFREI	FYIIGAVVVFV	VIIILVILAI
250	260		
ELHKCRKAGV	GQSNKENSPL	NVS	

FIG. 1

୪୮

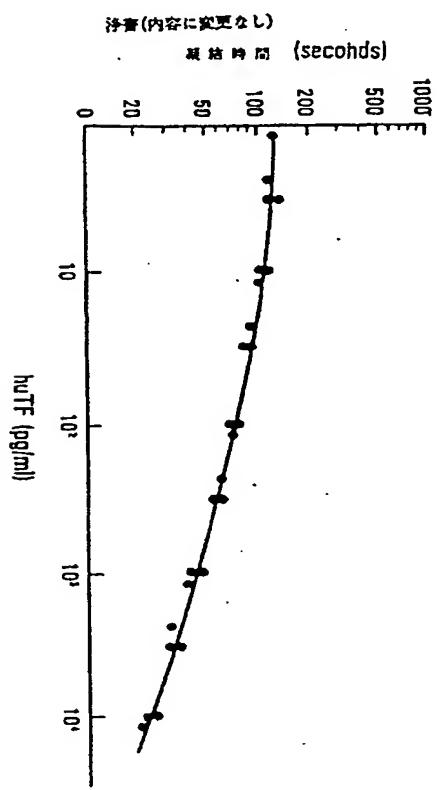


FIG. 2-1

特表平1-503438 (32)

FIG. 2-2

A	B	C	D
$\leftrightarrow 205\text{ k}$			
$\leftrightarrow 97.4\text{ k}$			
$\leftrightarrow 66\text{ k}$			
$\leftrightarrow 43\text{ k}$			
$\leftrightarrow 29\text{ k}$			
$\leftrightarrow 12.5\text{ k}$			
$\leftrightarrow 47\text{ k}$			

5
E

A B
FIG. 4

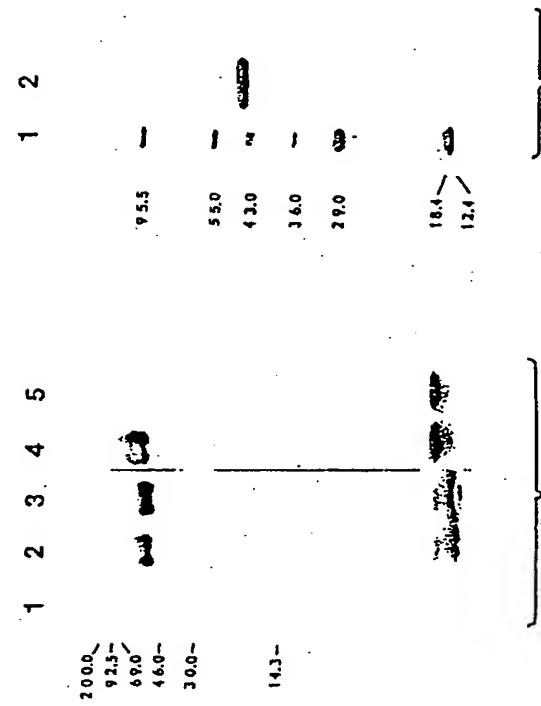
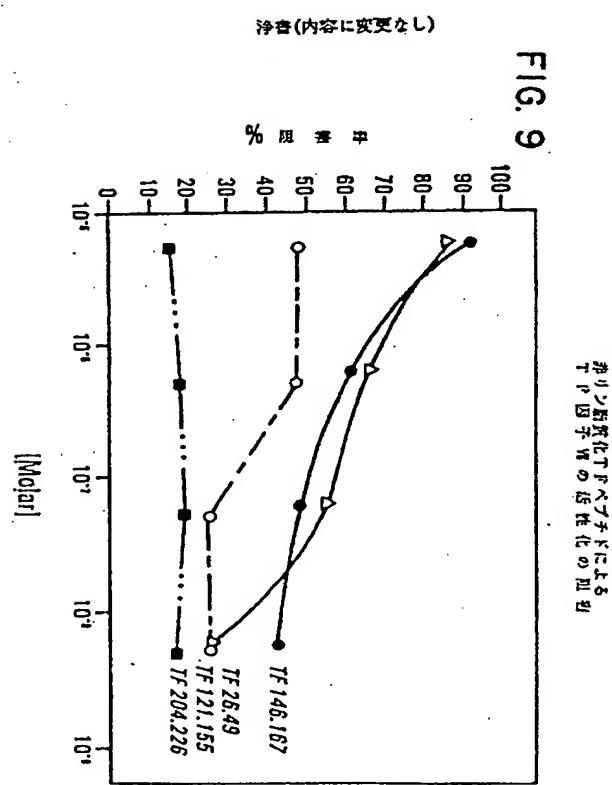
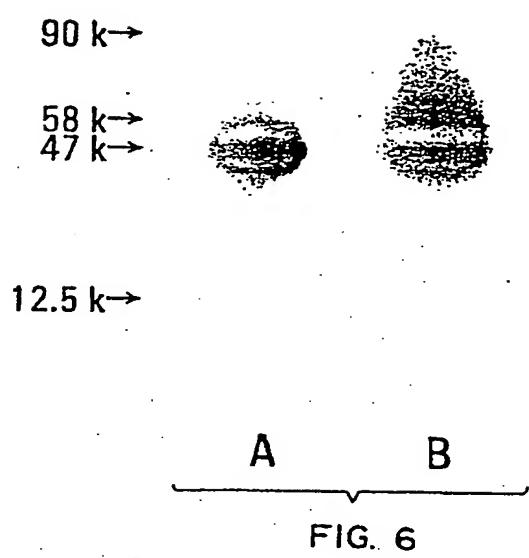


FIG. 8

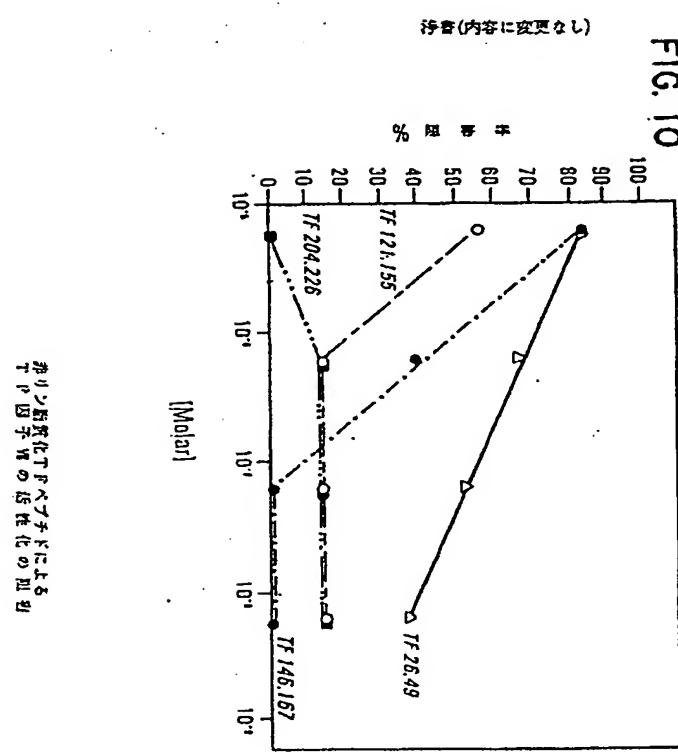


図 7 持表平1-503438 (33)

添書(内容に変更なし)

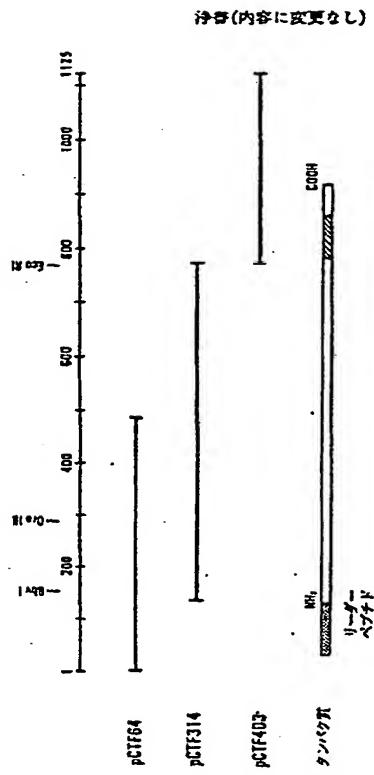


FIG. 11

添書(内容に変更なし)

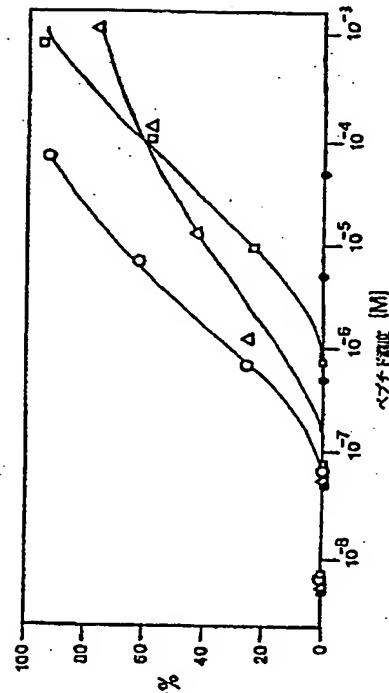


FIG. 12

添書(内容に変更なし)

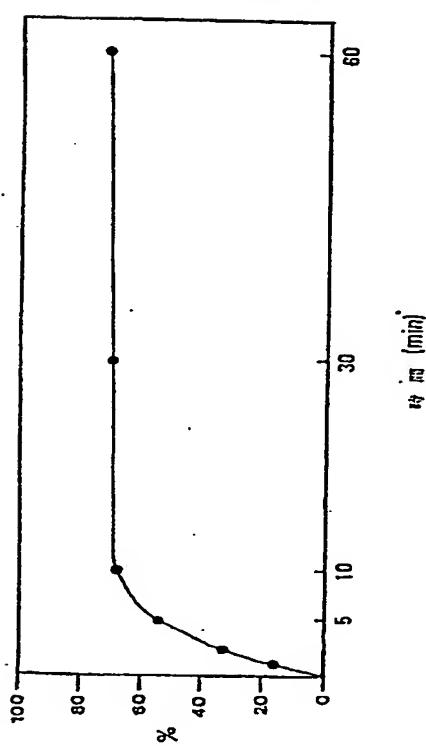


FIG. 13

添書(内容に変更なし)

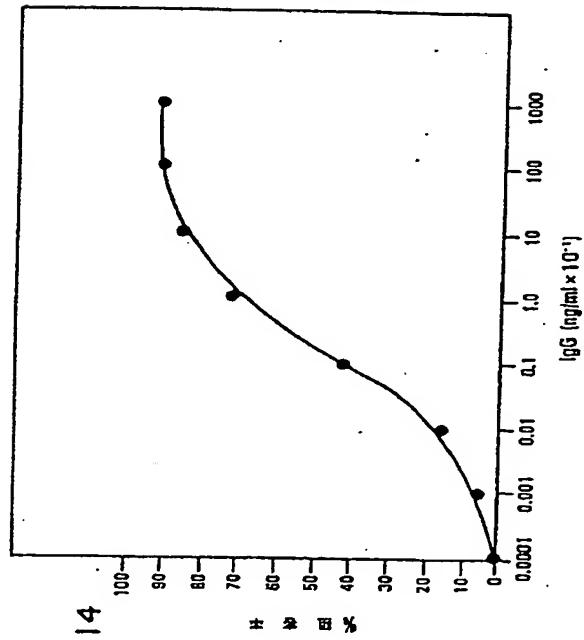


FIG. 14

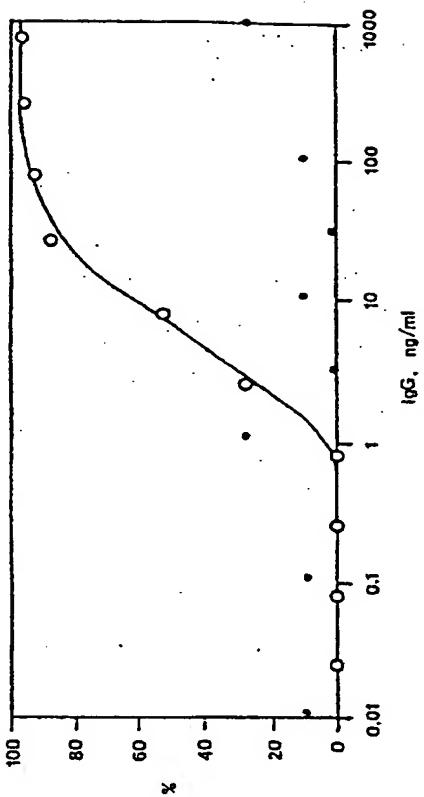


FIG. 15

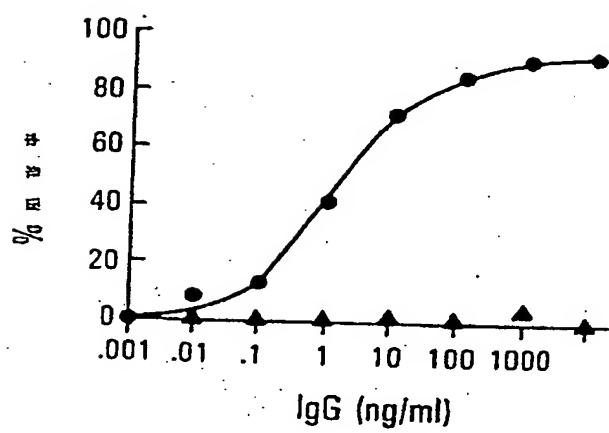


FIG. 16

FIG. 17

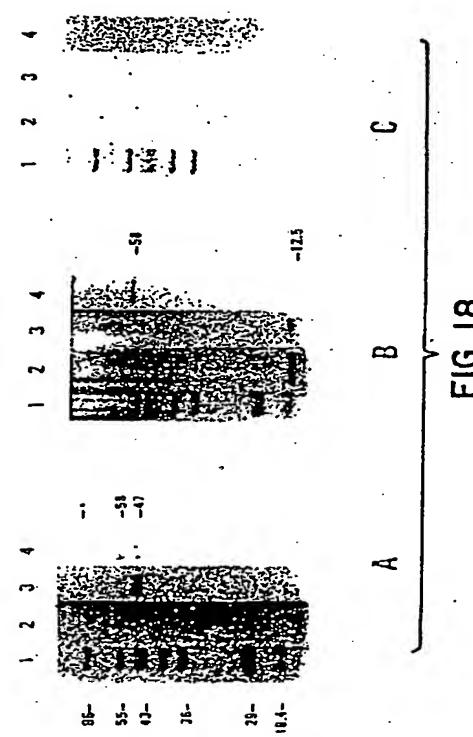
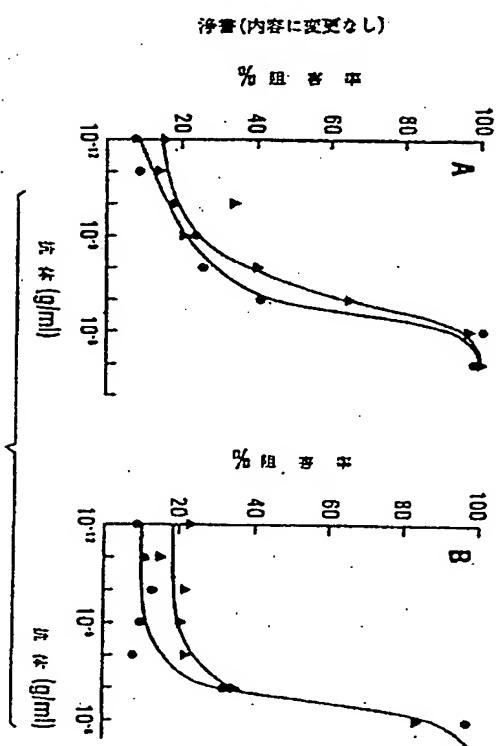


FIG. 18

持表平1-503438 (36)

手 捺 捕 正 音(方式)

1.8.31

平成 年 月 日

簽註處長官 声用文記

1. 事件の表示 PCT/US88/00998

2 発明の名称 ヒトの細胞因子に関するD.N.A.断片・ポリペプチド及び抗体

3. 指正をする者

事件との関係　出　　人

名 称 スクリップス クリニック アンド
リサーチ ファウンデーション

4代 理人

住 所 東京都千代田区丸の内3丁目3番1号

氏名(5995)弁護士中村

5. 捕正命令の日付 平成1年8月22日

6. 指正の対象 明細書及び請求の範囲の翻訳文
図面の翻訳文(第3、9、10、
11、12、13、14、16、17図)

7. 準正の内容 別紙のとおり

明細書、請求の範囲の翻訳文及び図面の翻訳文
(第3、9、10、11、12、13、14、16、17図)
の添付書 (内容に変更なし)

卷之三

卷之二

PCT/US/87/0005

DEPARTMENT INFORMATION CONTINUED FROM THE SECOND SHEET

X.P.	I.M. SCAMPATI ET AL., "Human tissue factor: cDNA sequence and chromosome localization of the gene". Biochemistry, Volume 26, pages 5234-5238, publishes 25 August 1987 by the American Chemical Society (Columbus, Ohio USA). See entire document.	1.11-1c and 17 3-10,18 16, 18-38, and 42-50
V.P.		

v. OBSERVATIONS WHERE CERTAIN CLAIMS WERE FOUND UNSEARCHABLE*

The International Search Report has been submitted in respect of certain claims under Article 31(2)(a) of the following reasons:

Claim numbers, because they relate to subjects which are not required to be disclosed by the inventors, namely

a. Data series 39-41, because they relate to some of the international applications that are handled by the Patent Office directly.
 Claim 39 recites "an antibody composition, according to claim 28" while claim 28 is not directed to an antibody. Claim 40 depends from claim 39. Claim 41 recites a "polypeptide of claim 15" while claim 15 is directed to a DNA. Hence, each of the claims 39-41 is incomplete and unsearchable.

Claim numbers, because they are incomplete with regard to disclosure with regard to the subject matter of PCT Rule 16(a).

v. OBSERVATIONS WHERE NATURE OF INVENTION IS LOCATED

The International Searching Authority has made available the following information on the international application as follows:

I. Claims 1-20 and 42-52. V. Claims 29-34, 36, 37
 II. Claims 21-24 and 38. AND 53-58.
 III. Claim 25.
 IV. Claims 26-28 and 35.

An international search report has been issued by the inventors, but International Patent Office does not have sufficient time to review it.

All or only some of the received international search reports have been sent, paid by the inventors, and International Patent Office does not have sufficient time to review it.

No received international search report has been paid by the inventors. International Patent Office is instructed to review it and make recommendations on its merits; it is retained by the inventors.

An international search report has been issued by the International Searching Authority and has been sent to the inventors.

The received search report has some deficiencies or contains a present error.

No search was conducted due to lack of sufficient information.

ALL DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		(CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)
Category	Description of Document, with name, location, where reproduced, of the relevant passages	Relevance to Case No.
Y	J.M. KISSLER ET AL, "Identification of a cDNA clone for bovine tissue factor", Federation Proceedings, Volume 45, page 1629, Abstract no. 927, published May 1986 by The Federation of American Societies for Experimental Biology (Bethesda, MD, USA). See entire document.	1-3b and 43-3g
X.P. Y.P.	E.M. SCARFATI ET AL, "Human tissue factors: cDNA cloning, primary structure, and chromosome localization", Federation Proceedings, Volume 46, page 2242 abstract no. 1846, published 1 May 1987 by The Federation of American Societies for Experimental Biology (Bethesda, MD, USA). See entire document.	1-11-1e and 17 22-1e 16-4e 38 and 42-3g
X.P. Y.P.	J.H. MORRISSETTE ET AL, "Molecular cloning of the cDNA for human tissue factor," Federation Proceedings, Volume 46, page 716, abstract no. 2238, published 1 May 1987 by The Federation of American Societies for Experimental Biology (Bethesda, MD, USA). See entire document.	1-3b, 11- 13 and 17 6-4v, 14-16, 16-3e and 42-3g
Y	S.D. CAREW ET AL, "Monoclonal antibodies against bovine tissue factor, which block interaction with factor VIIa", Blood, Volume 67, pages 132-136, published July 1986 by The American Society of Hematology, Grune & Stratton, Inc. (Orlando, Fla... USA). See especially pages 132-135.	1-3b and 42-3g
X.P. Y.P.	J.H. MORRISSETTE ET AL, "Molecular cloning of the cDNA for tissue factor, the cellular receptor for the initiation of the coagulation protease cascade", Cell, Volume 40, pages 123-135, published 3 July 1987 by Cell Press (Cambridge, Mass... USA). See entire document.	1-3b, 11-3 and 17 6-1v, 14-16, 16-3e, and 42-3g

DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category	Description	Reference No. Date No.
Y	R.H. AEBERSOLD ET AL, "Electroblotting onto activated glass", The Journal of Biological Chemistry, Volume 261, pages 4229-4238, published 25 March 1986 by The American Society of Biological Chemists, Inc., Wiley Press (Baltimore, MD, USA). See especially page 4229.	21-3e, 42-1e, 42-2e, 53-3e
Y,F	Chemical Abstracts, Volume 107, Number 17, issued 26 October 1987 (Columbus, Ohio, USA), S.P. CHASIN ET AL, "An inhibitor of biological antibody against human tissue factor", see page 539. The Abstract No. 152425n, Blood 1987, 70(2), 490-3(Eng.).	1-3e, bno, 42-3e
X,P	Chemical Abstracts, Volume 108, Number 9, issued 29 February 1988 (Columbus, Ohio, USA), K.L. RIBBLE ET AL, "Cloning and expression of human tissue factor (FXa)", see pages 195-196, The Abstract No. 700916c, Thromb. Res. 1987, 48(1), 69-99(Eng.).	1,11-14 anc, 17
Y	A. HINDEZ ET AL, "Transformation of yeast", Proceedings of the National Academy of Sciences USA, Volume 75, pages 1929-1933, published April 1978 by the National Academy of Sciences or the United States of America (Washington D.C., USA). See especially page 1929.	1-3e, anc 42-2e
Y	M. HOUGHTON ET AL, "The amino-terminal sequence of human fibroblast interferon as deduced from reverse transcriptase obtained using synthetic oligoribonucleotide primers", Nucleic Acid Research Volume 8, Number 9, pages 1913-1931, published May 1980 by IRL Press Limited (Oxford, England). See page 1913.	1-3e, anc 42-3e

第1頁の続き

④Int. Cl. 4	識別記号	府内整理番号
C 07 K 7/08		8318-4H
	7/10	8318-4H
	13/00	8318-4H
C 12 N 5/00	B-8515-4B	
C 12 P 21/02		6712-4B
G 01 N 33/53	D-7906-2G	
	L-7906-2G	
33/577	B-7906-2G	
//(C 12 P 21/02)		
C 12 R 1:91)		
C 07 K 99:00		

優先権主張 ②1987年6月25日@米国(US)③067,103
②1988年3月9日@米国(US)③165,939

④発明者 モーリジー ジェイムズ エイ アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92122 サン デイエゴ カチ

平成 7.12.20 発行

特許法第17条第1項又は第17条の2の規定による補正の掲載

昭和63年特許願第503555号(特表平1-503438号、平成1年11月22日発行公表特許公報)については特許法第17条第1項又は第17条の2の規定による補正があったので下記のとおり掲載する。

Int.Cl. [*]	識別記号	庁内整理番号
C12N 15/09	ZNA	
C07K 7/06		8318-4H
7/08		8318-4H
14/435		8318-4H
16/18		8318-4H
C12N 5/10		
C12P 21/02	C-9282-4B	
21/08		9161-4B
// A81K 39/396	N-9284-4C	
G01N 33/53	L-7055-2J	
	D-7055-2J	
33/577		7055-2J

(続きあり)

手 続 楽 正 書

1.3.28
平成 年 月 日

特許庁長官 高島 東 取

1.事件の表示 昭和63年特許願第503555号

2.発明の名称 ヒトの組換え因子に関するDNA断片・ポリペプチド及び抗体

3.補正をする者

事件との関係 出願人

名 称 スクリップス・クリニック アンド リサーチ
フランシジョン

4.代理人

住 所 東京都千代田区丸の内3丁目3番1号

電 話 (代) 3211-6741

氏 名 (5895) 井理士 中 村 雄

5.補正令の日付 自 発

6.〔本修正により請求の範囲に記載された請求項の数は合計「51」となりました。〕

7.補正の対象 明細書および請求の範囲の層

8.補正の内容

方書 (少)

3.29
印鑑

Int.Cl. [*]	識別記号	庁内整理番号
		A-9281-4B C12N 15/00 -ZNA B-7729-4B C12N 5/00

Int.Cl. [*]	識別記号	庁内整理番号
		A-9281-4B C12N 15/00 -ZNA B-7729-4B C12N 5/00

1. 請求の範囲を別紙の通り補正する。
2. 明細書64頁7行の「BLOTTING」の後、「PBSにおける、5% w/v 非脂防乾燥ミルク、0.01%アンチフォームA(シグマ製)、及び0.0001%マチオレート(methylolate)」を挿入する。
3. 同66頁13~14行の「TF8-5G9……TF8-5G9」を「TF8-5G9、TF8-5G9及びTF8-5G9」と補正する。
4. 同69頁18行の「6」を「2A」と補正する。
5. 同69頁20行の「6」を「2A」と補正する。
6. 同70頁9行の「TF8-5G9」を「TF8-5G9」と補正する。

平成 7.12.20 発行

請求の範囲

- (1) ヒトの組織因子重鎖タンパク質をコードする構造遺伝子を規定する配列を含む、わずか12 000ヌクレオチド塩基対を含むcDNA断片。

(2) 上記構造遺伝子が、以下のアミノ酸残基配列を有するタンパク質をコードする、請求の範囲(1)記載のcDNA断片。

10	20	30	40
SGTTNTVAA	NLTWKSTNFK	TILEWEPKPV	NQVYTVQIST
50	60	70	80
KSGDWKSKCF	YTTDTECDLT	DEIVKDVKQT	YLARVPSYPMA
90	100	110	120
GNVESTGSG	EPLYENSPEP	TPYLETNLGQ	PTIQSFEQVGM
130	140	150	160
TKVNVTVEDE	RTLVRNNNTP	LSLRDVFCKD	LIYTLYYWKS
170	180	190	200
SSSGRKRTAKT	WTNEFLIDVD	KGENYCFPSVQ	AVIPSRTVNR
210	220	230	240
KETDSPVEM	GQEKGEPREI	PYIIGAVVFV	VIIILVILAT
250	260	270	280
SLHKCRKACV	GQSWKNSPL	NVS	

(3) 上記構造遺伝子が、以下のヌクレオチド塩基配列を有する、請求の範囲(2)記載のDNA断片。

のDNA断片。

(4) 上記構造遺伝子が、以下のアミノ酸残基配列を有する可溶性ヒト細胞因子重鎖タンパク質をコードする、請求の範囲(1)記載のDNA断片。

10	20	30	40
SGTTNTVAAY	NLTWKSTNPK	TILEWEPKPV	NQVYTVQIST
50	60	70	80
KSGDWKSCKP	YTTDTECDLT	DEIVKDVKQT	YLARVFSYPA
90	100	110	120
GNEVESTGSAQ	EFLYIENSPEF	TPYLETNLCQ	PTIQSPEQVG
130	140	150	160
TKVNNTVVEDE	RTLVRNNTP	LSLRDVPGKD	LIVTLYYYWKS
170	180	190	200
SSSGKKTAXT	NTNEPLIDVD	KGENYCFCSVQ	AVIPSRTVNR
210			
KSTRDRHETK COEISGEPRE			

平成 7.12.20 発行

(5) 上記構造遺伝子が、以下のヌクレオチド塩基配列を有する、- 球状の範囲(4) 記載のDNA断片。

S C T T N T V A Y H L T U K S T
 TTAACGATTAATCTTGTGGCATATTTACTTCAGTACATTCT
 140 150 160 170 180

 N P P K T I L E U E P K P P N Q Y Y T V Q I S T K S G D U K M S
 ATTCTCAAGCTTTGATTCGATCAGCAACCGTAAACGTTCTTCC
 190 200 210 220 230 240 250 260 270

 X C F Y T I D T E C D L T D E I V K D Y K Q T Y L A R V F S
 AACCTTCAAGCAAGCAAGCTTATCTTACGCAAGCTTACGCTTACG
 280 290 300 310 320 330 340 350 360

 Y P A G N V K S T R S A G C B L Y E H S P E F T Y L E T H
 TACGCTTGCAAGCTTGGATGAGCTCTTCTGAGCTCTTACGCTTACG
 370 380 390 400 410 420 430 440 450

 L G Q P T I Q S F E Q V C T K V R U T V E D E I R T L V R R H
 CTGCAGCAGCAACGACATTTGACGCTTCAAGCTTACGCTTACG
 460 470 480 490 500 510 520 530 540

(6) 上記配列(第1の配列)の5'末端に連続し、かつ上記タンパク質のアミノ末端に結合した、アミノ酸残基リーダ配列をコードする第2の配列も含み、かつ該第1及び第2のDNA配列がヒト組織因子重頭前駆体タンパク質をコードする構成構造遺伝子を規定する請求の範囲(1)配載のDNA断片。

(7) 上記混成構造遺伝子が、以下のアミノ酸残基配列を有するタンパク質をコードする、請求の範囲(8)記載のDNA断片。

10 . 20 . 30 . 40
SGTTNTVAY NLTWKSTNPK TILEWEPKPV NQVYTVQIST

50 . 60 70 80
KSGDWKSXCF YTTDTECDLT DEIVKDVKQT YLARUVFSYPA

90 100 110 120
GNVESTGSAG EPLYENSPEP TPYLETHNLGQ PTIQSPEQVG

.130 140 150 160
TKVNVTVEDE RTLVRNNNTP LSLROVFGKD LIYTLYWKS

170 180 190 200
SSSGXXTAKT NTNEPLIDVQ KGENYCPSQV AVIPSRTVNR

210 220 230 240
KSTDSPVEM GQEKGEPREI PYIIGAVVFV VILLVILAI

250 260
SLAKCRKAGV GQSWXENSPL NVS

(8) 上記既成構造遺伝子が、以下のヌクレオチド塩基配列を有する。請求の範囲
(7) 紀載のDNA断片。

記載のDNA断片

平成 7.12.20 発行

(9) 上記既成構造遺伝子が、以下のアミノ酸配列を有する、可溶性ヒト組織因子直接タンパク質前駆体をコードする、請求の範囲(8)記載のDNA断片。

-30	-20	-10		
ME	TPAWPRVERP	ETAVARTLLL	GHWFAQVAGA	
10	SGTTNTVAAY	NLWKSTNPK	TILEWEPKPV	HQVYTVQIST
20			30	40
40				
50	KSGDWXSKCP	YTDTDTECDLT	DEIVKDVKQT	YLARVPSYPA
60				
70			80	
80				
90	GNVESTGSAG	EPLYENSPEF	TPYLETNLGQ	PTIQSPEQVG
100				
110			120	
120				
130	TKVNVTVEDE	RTLVRNNNTP	LSLRDVFGKD	LIYTLYYWKS
140				
150			160	
160				
170	SSSGKXTAKT	NTNEFLIDVD	KGENYCFSVQ	AVIPSRTVNR
180				
190			200	
200				

(10) 上記既成構造遺伝子が、以下のスクレオチド塩基配列を有する、請求の範囲
(9) 記載のDNA断片。

40	H E T P A U P R V P R P E T A V A R T	
50		
60		
70		
80		
90		
100	L L L C U V V P A Q V U A G A S C G T N T V A Y N N L T U K S T	
110		
120		
130		
140		
150		
160		
170		
180		
190		
200		
210		
220		
230		
240		
250		
260		
270		
280		
290		
300		
310		
320		
330		
340		
350		
360		
370		
380		
390		
400		
410		
420		
430		
440		
450		
460		
470		
480		
490		
500		
510		
520		
530		
540		
550		
560		
570		
580		
590		
600		
610		
620		
630		
640		
650		
660		
670		
680		
690		
700		
710		
720		

50	M I F L S L A D V R G K D L I Y T L Y U K S S S G K K T	
60		
70		
80		
90		
100		
110		
120		
130		
140		
150		
160		
170		
180		
190		
200		
210		
220		
230		
240		
250		
260		
270		
280		
290		
300		
310		
320		
330		
340		
350		
360		
370		
380		
390		
400		
410		
420		
430		
440		
450		
460		
470		
480		
490		
500		
510		
520		
530		
540		
550		
560		
570		
580		
590		
600		
610		
620		
630		
640		
650		
660		
670		
680		
690		
700		
710		
720		

平成 7.12.20 発行

(1) ビト被継因子重複タンパク質をコードする構造遺伝子を規定する第1のDNA断片に特異的に結合したベクターを含む組換えDNA分子。

(12) 上記構造遺伝子が、以下のアミノ酸残基配列を有するタンパク質をコードする、請求の範囲 (11) 記載の組換え DNA 分子。

(13) 上記構造遺伝子が、以下のヌクレオチド塩基配列を有する、請求の範囲(11)記載の組換えDNA分子。

10	20	30	40
SGTTNTVAAY	NLTWKSTNPK	TILEWEPKPV	NQVYTVQIST
50	60	70	80
KSGDWKSXCF	YTTDTECDLT	DEIVKDVKQT	YLARVPSYPA
90	100	110	120
GNVESTGSGA	EPLYENSPEP	TPYLETNLQQ	PTIQSPEQVG
130	140	150	160
TKVNVTVEDE	RTLVRNNNTP	LSLRDVPGKD	LITYTLYYWKS
170	180	190	200
SSSGXXKTAKT	NTNEFLIDVD	XGENYCFSVQ	AVIPSRTVNRR
210	220	230	240
KSTDSPVZCM	GQEKGEPREI	ZYIIGAVVFV	VIIILVILAI
250	260		
SLHKCRKAGV	CQSWKNSPL	NVS	

(14)さらに、上記第1の断片の5'末端に連続し、かつ上記タンパク質に結合したアミノ酸残基リーダー配列をコードし、かつ該第1及び第2のDNA断片が、上記タンパク質の前駆体をコードする況み構造遺伝子を規定する、請求の範囲(11)記載の組換えDNA分子。

(15)上記成績成達伝子が、以下のアミノ酸残基配列に対応するアミノ酸残基配列を有する、上記タンパク質の前駆体をコードする、請求の範囲(1)記載の組換えDNA分子。

平成 7.12.20 発行

-30 -20 -10
ME TPAWPRVPRP ETAVARTLLL GHVPAQVAGA

(18) 上記混成構造遺伝子が、以下のヌクレオチド塩基配列に対応するヌクレオチド塩基配列を有する、請求の範囲(15)記載の組換DNA分子。

10 20 30 40
SGTTNTVAAY NLTWKSTNFK TILEWEPKPV NOVYTVQIST

T	GACCC	450	N
T	GAGCT	360	M
T	GAATC	270.	C
T	GAATT	180.	A
T	GAATTC	5	S
T	GAATTC	5	C
T	GAATTC	5	R
T	GAATTC	5	M

50 60 70 80
XSGDWKSCKP YTTDTECDLT DEIVXDVKQT YLARVFSYPA

T	GACCC	450	N
T	GAGCT	360	M
T	GAATC	270.	S
T	GAATT	180.	C
T	GAATTC	5	A
T	GAATTC	5	C
T	GAATTC	5	G
T	GAATTC	5	T

90 100 110 120
GNVESTGSG EPLYENSPF TPYLETNLGO RTIOSFEOVG

· R P	ccccccccc	-	7
A Y	ACCATAT	16	
S T	ACCACT	23	
Q T	CAACCC	34	
E F	GAGTC	43	
D E	CATCAA	22	

130 140 150 160
TKVNVTVEDE RTLVRRNNTE LSLRDVEGKD LIYTLVYWES

3
2 H
1 V T
K O
J
I
H ACTIVITAT
T V
U
N T

170 180 190 200
SSSGKXTAKT NTNEELIDVD XGENYCPESVO AVIPSRTVNB

210 220 230 240
KSTDSPVEM GOEXGEFREI XIIIGAVVVV VIIIILILAI

ก ๑
ก ๒
ก ๓
ก ๔
ก ๕
ก ๖
ก ๗
ก ๘
ก ๙
ก ๑๐

250 260
SLHKCRXAGV GQSWKENSPL NVS

410
110
200
200
110
A 7
A 7
A 7
A 7
A 7
A 7
A 7
A 7
A 7

(17) 上記ベクターが上記第1及び第2のDNA断片の複製を指揮しうる、請求の範囲(11)記載の組換えDNA分子。

(18) 上記ベクターが、宿主細胞中、上記タンパク質を発現しうる、請求の範囲
(11) 記載の組換えDNA分子。

(19) 上記ベクターが、宿主細胞中、上記前駆体タンパク質を発現しうる、請求の範囲(14)記載の組換えDNA分子。

(20) 上記ベクターが、pKSV-10であり、かつ、上記混成構造遺伝子が、可溶型の上記前駆体タンパク質をコードし、かつ、以下のヌクレオチド配列を有

する、請求の範囲(18)記載の組換えDNA分子。

平成 7.12.20 発行

(21) わずか 50 アミノ酸残基を含み、かつ、
 -VHQVVTYQIST- 及び
 -LYWKSQQSCKT -

からなる群から選ばれた式で表わされる配列に対応するアミノ酸残基を含む、ヒト組織因子結合部位ペプチド類似物。

(22) 上記ボリペプチドが、式：

H-VNQVYTVQIST-OH

で表われる、請求の範囲(2)記載のポリペプチド類似物。

(23) 上記ボリペプチドが、式：

H-LYNNSSSSGKKT-OH

で表われる、請求の範囲(21)記載のポリペプチド類似物。

(24) H-EPKPYNQVITYQISTKSGDIKSCK-COH .

R-VPGKDLIYTLYWKSSSSCKKT-DH . & S

B-SSSGKKTAKTNENPLIDVDKGENTYCPSTV-OR.

からなる群から選ばれた式で表わされるヒ

(25)

H-SOTTIVMVAWLNSTKFTTLEWEFPKV-0H,
H-TKSMDGKSCFCYTTDTECOLTDIEVKDVQKQT-0H,
H-KSGDNHKSKC-0H,
H-ECDLTDEIEVKDVQKQT-0H,
H-LARVTSYPAVGNESTCGSAGEFLYENSPEFTPYLC-0H,
H-YERSPEFTTYLTLHCGPQTIGQSFEQVCTKTV-0H. RU
H-QAVIPSRTVNRKSTDSPVEC-0H.

からなる群から選ばれた式で表わされるヒト組織因子結合部位ポリペプチド類似物。

(26)a)ヒト組織因子産生タンパク質と免疫反応し、

b)

H-EPKPVNVQVTVQK1STKSGDKHKS^CKC-CH,
 H-^NVGDLDLTTLYWKS6S6GKCT-CH,
 H-ESSGCKKTAAXTMTFELIDVDRGCEYCFSV-CH,
 H-KCTTNTVAANLWIKSTNFKTILEWPFPKV-CH,
 H-TESGDKWSKCFPTTDTEDCDLTDEIVKDVQQT-CH,
 H-KSCDMDKEKC-CH,
 H-ECDLTDTEIVKDVQQT-CH,
 H-LARVFSPAGHVVESTGSACEP^LYENSPETTPYL^C-CH,
 H-ENSPETTPYL^ELNQCPQTQI^SP^TEVQVCTKV-CH, *RG*
 H-QAVIFPTKTVRXTSDPVEC-CH; *RJ*.

からなる群から選ばれた式で表わされるポリペプチドと免疫反応し、かつ
c) DSPVBCM CQKNCBPRRI PYYIICL で示されるポリペプチドと実質的に免疫
反応しない。

抗体分子不含心、抗体组成部分。

(27) 上記抗体がラベルに結合している、被液の範囲 (28) 尼葛の組成物、

(28)上記抗体が、生理学的に許容しうる希釈剤中に存在する、請求の範囲 (28)
記載の組成物。

(29)ヒト組換え因子重複タンパク質及び配列: EPKPV NQVYTIVQIST KSGDWKSCK
で表わされるポリペプチドと免疫反応する抗体分子を産生する、TPB-5
と命名されたハイブリドマ。

(30)請求の範囲 (28)記載のハイブリドーマにより生産される抗体分子を含むモノクローナル抗体組成物。
 (31)ヒト組成因子疾患タンパク質及び配列: EPKPV NVQVITYQ1ST KSGDNWKSRC
 で表わされるポリペプチドと免疫反応する抗体分子を生産する。T F 9 - 1 0

(32)請求の範囲(31)記載のハイブリドーマにより産生される抗体分子を含むモノクローナル抗体組成物。

(33)ヒト組織因子重畳タンパク質及び配列: YFGKD LIYLTLYWKS SSSCETT で表わされるポリペプチドと免疫反応する抗体分子を产生する、TF 9-6B4と命名したハイブリドーマ。

平成 7.12.20 発行

(34) 前次の範囲(33)記載のハイブリドーマにより産生される抗体分子を含むモノクローナル抗体組成物。

(35)a) 身体サンプルを、ヒト組織因子重鎖タンパク質と混合し、免疫反応混合物を作る：

b) この混合物を、上記抗体がサンプル中に存在するヒト組織因子と免疫反応し、免疫反応産物を形成するのに十分な時間維持する、そして、

c) ステップb)で生成した免疫反応産物の存在を検定する。

以上a)～c)のステップを含む、体液サンプル中のヒト組織因子重鎖タンパク質の存在を検定する方法。

(36)a) 前次範囲(22)記載の抗体組成物を含有するパッケージを含むサンプル中に存在するヒト組織因子重鎖ケンパク質の存在を検定するため、キットの形をした診断システム。

(37) 上記モノクローナル抗体分子を含む上記抗体組成物が、

a) TP 8-5 G 8、

b) TF 9-8 B 4、

c) TF 9-10 H 10、

からなる群から選ばれたハイブリドーマにより産生される、請求の範囲(36)記載の診断システム。

(38)a) サンプルを、請求の範囲(15)記載のポリペプチドを固体マトリックスに固定した固体サポートと混合して、結合反応混合物を形成する。

b) 上記結合反応混合物を、凝血因子が上記ポリペプチドと結合し、固相複合体及び上清を形成するのに十分な時間維持する。

c) 上記複合体から上記上清を分離する、及び

d) ステップc)の分離した複合体から、上記凝血因子を回収する。

以上、a)～d)のステップを含む、サンプルから血液凝固因子VII/VIIaを分離する方法。

(39) 実質的に、ヒト組織因子重鎖タンパク質を含まない生理学的活性のあるヒト組織因子重鎖タンパク質の水溶液を含む組成物。

(40) 上記生物学的活性のあるヒト組織因子重鎖タンパク質を、リン脂質中に分散

(43)a)少なくとも1回の検定を行うのに十分な量の、実質的にヒト組織因子重鎖タンパク質を含まない、生物学的活性のあるヒト組織因子重鎖タンパク質の水溶液を含有する組成物を含むパッケージ、

を含む血管システム液体サンプル中での凝固能を検定するキットの形をした診断システム。

(44) 上記重鎖タンパク質がリン脂質中に分散している、請求の範囲(43)記載の診断システム。

(45) 上記タンパク質が可溶性であり、かつ、以下のアミノ酸残基配列を有する、請求の範囲(43)記載の診断システム。

10 20 30 40
SGTTNTVAAY NLTKSTNPK TILEWEPKPV NQVYTVQIST

50 60 70 80
KSGDWKSCKP YTTDTECDLT DEIVKDVKQT YLARVPSYPA

90 100 110 120
GNVESTGSAG EPLYENSPEP TPYLETNLGQ PTIQSPEQVC

130 140 150 160
TKVNVTVEDZ RTLVRRNNTF LSLRDVPGKD LIYTLYYWKS

170 180 190 200
SSSGKKTAKT NTNEFLIDVD KGENYCPSVQ AVIPSRTVNR

210
KSTDSPVEM CQEKGEPRE

させた、請求の範囲(39)記載の組成物。

(41) 上記溶液が、非イオン性界面活性剤を含む、請求の範囲(39)記載の組成物。

(42) 上記タンパク質が可溶性であり、かつ、以下のアミノ酸残基配列を有する、請求の範囲(39)記載の組成物。

10 20 30 40
SGTTNTVAAY NLTKSTNPK TILEWEPKPV NQVYTVQIST

50 60 70 80
KSGDWKSCKP YTTDTECDLT DEIVKDVKQT YLARVPSYPA

90 100 110 120
GNVESTGSAG EPLYENSPEP TPYLETNLGQ PTIQSPEQVC

130 140 150 160
TKVNVTVEDZ RTLVRRNNTF LSLRDVPGKD LIYTLYYWKS

170 180 190 200
SSSGKKTAKT NTNEFLIDVD KGENYCPSVQ AVIPSRTVNR

(46)a)ヒト組織因子重鎖タンパク質をコードする構造遺伝子を規定する第1のDNA断片及び、第1のDNA断片と連続しており、かつ上記タンパク質に結合する、アミノ酸残基リーダー配列をコードする第2のDNA断片で、該第1及び第2のDNA断片合せて上記タンパク質の前駆体をコードする合成導達遺伝子を規定しているDNA断片と機能的に結合する、小乳頭細胞に適合する発現ベクターを含む組換えDNA分子でトランスポームした小乳頭細胞の栄養培地での培養を開始する；

b) 上記培養物を上記細胞が上記組換えDNA分子由来のタンパク質を発現し、かつ、上記成熟タンパク質を形成するのに十分な時間、維持する、そしてc)上記培養物から、上記成熟タンパク質を回収する。

以上、a)～c)のステップを含む、成熟ヒト組織因子重鎖タンパク質の調製方法。

(47) 上記合成構造遺伝子が、以下のヌクレオチド塩基配列を有する、請求の範囲(46)記載の方法。

7.12.20 発行

H T F S L R D V G K D L I Y I Y U K S S S C K N T
 A N D C T T T A M C C T A C C T T T T T C C A C C T T A T T A C T T A T T A C T T A T T A C T T A M C C T T C A G T T C A M C C A M A C A
 550 560 570 580 590 600 610 620 630
 +
 A K T M T F L I D V D K G C H E M Y C P S V Q A V I P S R T
 C C A M C A M C A C T A T C T T T T T T T C C T T A C T T A C T T A C T T A C T T A C T T A C T T A C T T A C T T A C T T C C C C A
 440 450 460 470 480 490 500 510 520
 +
 V N R K S T D S P V E C H G Q B K C E F R E
 C T T M C C M C A G T A G A C C C A C C C A C C C A C C C A C C C A C C C A C C C A C C C A G A G A
 730 740 750 760 770 780 790 710 720
 7. 1

- (48)請求の範囲(46)記載の方法により產生した、成熟ヒト組織因子重鎖タンパク質を基本的に含む組成物。

(49)請求の範囲(47)記載の方法により產生した成熟ヒト組織因子重鎖タンパク質を基本的に含む組成物。

(50)ヒト組織因子重鎖タンパク質及び配列：EPIKY NOVITVQVQIST KSGDWKSICで表わされるポリペプチドと免疫反応する抗体分子を產生する、TF-9-5B1と命名されたハイブリドーマ。

(51)請求の範囲(50)記載のハイブリドーマにより產生される抗体分子を含むモノクローナル抗体組成物。

手 桃 捕 正 音 (方 式)

平成7年2月8日

教育長官署

1.事件の表示 昭和63年特許第503555号
(PCT/US88/00998).

2 発明の名称 ヒトの網織因子に関するDNA 断片・ポリペプチド及び抗体

3. 指正をする者
事件との関係 明確人

名 称 スクリップス クリニック アンド リサーチ
フounshion AniShion

4代 現人
住所 東京都千代田区丸の内3丁目3番1号
電話(代) 3211-8741
氏名 (5805) 齋藤太一郎

5 捕獲令の日は 平成1年8月22日

明細書および請求の範囲の翻訳文
図面の翻訳文(第3、9、10、11、12、13、14、15、17図)

7. 検正の内容

明細表、請求の範囲および図面の翻訳文(第3、9、10、11、13、14、16、17回)の後置。(複数に分割なし)

方式一 烟

平成 7.12.20 発行

明細書

ヒトの組織因子に関するDNA断片、
ポリペプチド及び抗体

(本出願の関連文獻)

本発明は、1987年3月31日に出版された米国出版第033,047号及び1987年6月25日に出版された出版第067,103号の部分複数出版である。

(技術分野)

本発明は、ヒトの組織因子重複タンパク質(huTFh)をコードする構造遺伝子を有する組換えDNA分子(rDNA)に関するもので、より詳細には、本発明は、宿主細胞中に含まれる、huTFhを発現しうる発現ベクターに関するものである。また、本発明は、huTFhの合成ポリペプチド類似物及びトロトアト及び該ポリペプチド類似物と結合するモノクローナル抗体に関するものである。

(発明の背景)

凝血は、一群の凝集因子として知られる細胞性及び血漿性タンパク質によって仲介される。一連の、酵素、共因子、タンパク質分解及びゲル化反応のガスケードによって起こる。このガスケードの開始は、組織因子(TF)として知られる細胞性レセプターが、凝集因子VII又はその調導体、因子VIIaと結合し、触媒的に活性のある複合体を形成したときに起る。TFの非存在下、及び複合体への選択的結合がない場合には、VII/VIIaは凝集を開始しない。従って、TFの化学的かつ生物学的特性が、凝集のメカニズムを理解する上で重要なことは明白である。

組織因子は、通常循環器中で可溶化しておらず、また、因子VII/VIIa及び他の凝集因子を含む血漿タンパク質と接触できないことが分っている。既に結合した時タンパク質である。組織因子は

混合物の界面活性剤及びイオン組成に影響されると報告されている。ネマーソン(Nemerson)、ジャーナル・オブ・クリニカル・インベスチゲーション(J. Clin. Invest.)47~72頁(1968);ネマーソン(Nemerson)、ジャーナル・オブ・クリニカル・インベスチゲーション(J. Clin. Invest.)48~322頁(1969年)及びカーソン(Carson)等、サイエンス(Science)、208卷、307頁(1980年)参照。

単離した、もしくは、再溶質化したTF含有タンパク質類似物は、数々の種の組織から抽出物によって調製した。組織因子は、天然の組織中に非常に少量しか存在しないので、歴史的に使用されてきた方法は、困難で、時間もかかり、かつ低收率であった。古典的方法のレビューとしては、ネマーソン(Nemerson)等の報告(プログレス・イン・ヘマトシス・アンド・トロンボシス(Prog. Hem. Thromb.)6卷、237~261頁(1982年)を参照せよ。

最近、ブローズ(Brose)等(ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.)250卷、10917~20(1985年))ボム(Bom)等(トロンボ・リサーチ(Thromb. Res.)42卷、635~643頁(1986年)及びグハ(Guba)等(プロシーディング・イン・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci.)USA 83卷、299~302頁(1986年))は、脱脂質化組織因子タンパク質を、非イオン性界面活性剤及びCa,Ca²⁺を含む水溶性溶液に溶かした時、該タンパク質が因子VII/VIIaと結合するという発見に基づいた方法を用いて、ヒトの組織因子(huTF)タンパク質を単離したことを報告している。しかし、組織因子タンパク質を単離する手段として、因子VII/VIIa親和性吸着剤を用いる。これ

通常、血管を形成している細胞の表面には発現されていないが、血管中の单球によるその発現は、バクテリアのリボ多糖のような感染性試験成分、ある抗原により刺激されたTヘルパー細胞から説明され、直接的にはある刺激されたTヘルパー細胞由来のリンキオイン及び免疫調合体によって説明することができる。例えばバクテリアのリボ多糖同様、インターロイキン1及び腫瘍死因子アルファのような單細胞/マクロファージのある炎症仲介物は血管の内皮側表面にTFを発現する内皮細胞を刺激することができる。典型的に、血管要素におけるTFの発現は、拡大する血管内膜血又は、局部的な凝血の開始、すなわち血栓形成を起す。

組織因子は、試験管内の離離芽細胞を含む培養物中のある血管外細胞、未同定型の細胞及び基底膜バリアにより、産生する血漿タンパク質から分離されている上皮細胞の表面に構成的に発現される。これら細胞上のTFの存在は、組織因子の結果としての血液との接触でクロットを形成する。従って、TFは、凝血システムが開始する基礎である。

ハウエル(Bowell)(アメリカン・ジャーナル・オブ・フィジオロジー(Am. J. Physiol.)31卷1頁(1912年))の報告は、TFを含む单離した組織タンパク質類似物は、リン脂質-タンパク質(リボタンパク質)複合体として存在するときのみ凝血を促進することができる事を示す最初の報告である。典型的に、TF含有組織タンパク質の单離が、通常アタシタンパク質と会合しているリン脂質を除去してしまって、单離したタンパク質を再脂質化することによるTFの機能的プロコアグラン特活性の再構成が必要である事から、これら再構成の研究が多くの研究者によって行なわれてきている。例えば、凝血活性の回復は、リン脂質のタイプ、タンパク質に対するリン脂質の比、及び再構成

方法の使用は、有茎葉の单離VII/VIIaを入手することの困難性のみならず、因子VII/VIIaの不安定性によても制限される。

ブローズ等(上記)は、huTFに特異的なモノクローナル抗体の開発及び免疫調和性吸着剤としてのそれらの使用は、因子VII/VIIa使用の制限によって起こる問題を回避できることを指摘している。しかし、抗体トロトアトモノクローナル抗体は、該文献中には報告されていない。さらに、牛のTFによって生じる2つのモノクローナル抗体(カーソン(Carson)等、ブラッド(Blood)662卷156頁(1985年))は、トロトアトとは免疫反応を起こさない(グハ(Guba)等、上記)。

(本発明の概要)

1つの目標において、本発明は、ヒトの組織因子重複(huTFh)タンパク質をコードする構造遺伝子を限定する配列を含む、わずか約12,000塩基対を含むDNA断片を考案している。該構造遺伝子が、第1図の約1番から約263番で示されているアミノ酸残基を有するタンパク質をコードしていることが好ましい。さらに、該構造遺伝子は、第2図の約130番から、約918番で示されるヌクレオチド塩基配列を有することが好ましい。

望ましい結果においては、そのDNA断片は、第1の配列の5'末端と連続し、かつ、トロトアトタンパク質のアミノ末端に結合したアミノ酸残基リーダー配列をコードする第2の配列をも含む。その第1及び第2のDNA配列は一緒にになって、ヒトの組織因子重複前駆体(プレトロトアトTFh)タンパク質をコードする混成構造遺伝子を定義している。該構成構造遺伝子は第1図の約32番から約263番で示されるアミノ酸残基を有するタンパク質をコードしていることが好ましい。さらに、該構成構造遺伝子は、第2図の約34番から約918番のヌクレオチド塩基配列を

平成 7.12.20 発行

有することが望ましい。

別の態様において、本発明は、ヒトの組織因子遺伝子タンパク質をコードする1つの構造遺伝子を定義する第1のDNA断片と機能的に結合したベクターを含む複数のDNA分子を考案している。さらに該複数のDNA分子は、第1の断片の5'末端に連結し、上記タンパク質に結合するアミノ酸残基リーダー配列をコードする第2のDNA断片を含むことが好ましい。すなわち、上記の第1及び第2のDNA断片は一括になって、上記タンパク質の前駆体をコードする構成遺伝子を定義している。

別の態様において、本発明は、わずか約50アミノ酸残基を含み、かつ式

-VNQVYT-

で表わされる配列に相当するアミノ酸残基配列を含むヒトの組織因子結合部位のポリペプチド類似物を考案している。

さらに好ましくは、本発明はわずか約50アミノ酸残基を含み、かつ、

-VNQVYTQIST-, B6

-LYWKSSESGKTT-

からなる群から選択される式で表わされる配列に相当するアミノ酸残基を含むヒトの組織因子結合部位のポリペプチド類似物を考案している。

さらに本発明の態様には、

a) ヒトの組織因子遺伝子タンパク質と免疫反応する、

b) H-EWEPKPVNQVYT-OH,
H-EPKPVNQVYTQ15TKSGDWKSXC-OH,
H-VFGKDLIYTLYWKSSESGKTT-OH,
H-RDVFCKDLIYTLYWKSSESGKTT-OH,
H-IVTLYWKSSESGKTTAK-OH,
H-SSSGKXTAKTNTHFLIDVNDGENYCFSV-OH,

また、本発明は、

a) 生理学的に許容される帯状剤及び効果的な生体内指示手段と結合させたハイブリドーマTF9-10H10によって作られたある量の抗体分子を含むモノクローナル抗体組成物を被検者に静脈注射により投与し、血栓中に存在するヒトの組織因子と免疫反応させる、
b) 該抗体分子が、血栓の一部として生体内に存在する組織因子と免疫反応し、かつ、免疫反応物質を形成するのに十分な時間、その投与を受けた被検者を維持する、
c) ステップb) で生成した免疫反応生成物の存在を検定する、以上a) ~ c) のステップを含む、生体内で血栓を検出する方法も考案した。

さらに、本発明は、TF8-5G9及びTF9-5B4からなる群から選択されるハイブリドーマにより生成され、存在するヒトの組織因子と効率よく結合する、ある量の抗体分子を含む生理学的に許容される帯状剤を含有するモノクローナル抗体組成物を、被検者に静脈注射によつて投与することを含む、生体内で、凝集因子VII/VIIIと結合するヒトの組織因子の能力を中和する方法も考案している。

また、本発明は、因子VII/VIIIと反応するのに有効な量の、

H-EWEPKPVNQVYT-OH,
H-EPKPVNQVYTQ15TKSGDWKSXC-OH,
H-VFGKDLIYTLYWKSSESGKTT-OH,
H-RDVFCKDLIYTLYWKSSESGKTT-OH,
H-IVTLYWKSSESGKTTAK-OH, B6
H-SSSGKXTAKTNTHFLIDVNDGENYCFSV-OH;

からなる群から選ばれるポリペプチドを含む生理学的に許容され

H-SGTINTVVAAYBLTVKSTHFKTYLNEWPKPV-OH,
H-TKSGDWKSXCFTYTTIDTECDLTDEIVKDVKQTY-OH,
H-KSGDWKSXC-OH,
H-ECDLTDEIVKDVKQTY-OH,
H-LARVFSYPAGIVESTGSAGEPLVENSPEFIPVLC-OH,
H-YENSPFIPYLETILGQPTIQSFIQVGTKV-OH, B6
H-QAVIPSRTRVKSTDSPVEC-OH; B6

からなる群から選択される式で表わされるポリペプチドと免疫反応する、

c) 実質的に第1図の部位204から部位226で示される式で表わされるポリペプチドとは免疫反応しない、

抗体分子を含む抗体組成物である。

また、本発明は、ハイブリドーマTF8-5G9、TF9-10H10、TF9-5B7及びTF9-5B4と、それらハイブリドーマによって生成される抗体分子を含むモノクローナル抗体組成物を考案している。

本発明は、

a) 身体試料を、ヒトの組織因子遺伝子タンパク質と混合し、免疫反応液を作成する、

b) その混合液を、抗体が、その試料中に存在するヒトの組織因子と免疫反応し、免疫反応産物を作るのに十分な時間維持する、そして、

c) ステップb) で生じた免疫反応産物の存在を検出する、

以上のステップを含む体液試料中のヒトの組織因子遺伝子タンパク質の存在を検定する方法も考案している。

る帯状剤を含有するポリペプチド組成物を、静脈注射で被検者に投与することを含む、生体内で、ヒトの組織因子が、凝集因子VII/VIIIと結合することを阻害する方法を考案している。

別の態様において、本発明は、本発明の抗体組成物を含有するパッケージを含む、試料中のヒトの組織因子遺伝子タンパク質の存在を検定する、キットの形をとった診断システムを考案している。

その抗体組成物は、

a) TF8-5G9,

b) TF9-5B4,

c) TF9-10H10,

d) TF9-5B7。

からなるハイブリドーマの群から選ばれたハイブリドーマにより生成されるモノクローナル抗体を含むことが望ましい。

また、試料から血液凝集因子VII/VIIIを早期する方法も考案された、

この方法は、

a) 固体フリックスに固定した、請求項15記載のポリペプチドを含む固体サポートと試料を混合することにより結合反応混合物を作る、

b) 上記結合反応混合物を、上記凝集因子が上記ポリペプチドと結合し、固体複合体及び上清を作ることに十分な時間、維持する、

c) 上記複合体から、上記上清を分離する、そして

d) ステップc) の分離した複合体から、上記凝集因子を回収する、以上、a) ~ d) のステップを含む、

さらに、実質的に、ヒトの組織因子遺伝子タンパク質を含まない、生物学的に活性のあるヒトの組織因子遺伝子タンパク質の水溶液を含む組成物を考案した。この生物学的に活性のあるヒトの組織因

平成 7.12.20 発行

子宮頸タンパク質は、リン脂質又は、非イオン性界面活性剤中に分散されていることが望ましい。

直管系液体試料中の殺虫能力を検定するための、キットの形をとった診断システムも考案された。それは、実質的にヒトの組織因子遺伝子タンパク質を含まない、少なくとも1回の検定を行うのに十分な量の、生物学的に活性のある、ヒトの組織因子遺伝子タンパク質の水溶液組成物を含有するパッケージを含む。その遺伝子タンパク質は、リン脂質中に分散されていることが望ましい。

別の方法において、成熟したヒトの組織因子遺伝子タンパク質の調製法及びその方法によるタンパク質発現産物も考案されている。この方法は、

- 1) 培養培地中、ヒトの組織因子遺伝子タンパク質をコードする構造遺伝子を定位する第1のDNA断片及びその第1の断片に連続し、かつ、上記タンパク質に付随するアミノ酸残基リーダー配列をコードする第2のDNA断片と機能的に結合し、宿主細胞と適合する発現ベクターで、上記第1及び第2のDNA断片が上記タンパク質の前駆体型をコードする構造遺伝子を定位するものであるようなベクターを含む組換えDNA分子でトランスホームした宿主細胞の増殖を開始する。
- 2) その培養物を、上記細胞が、上記組換えDNA分子からタンパク質を発現し、かつ、上記成熟型のタンパク質を形成するのに十分な時間維持する、そして、
- 3) 上記培養物から、上記成熟型のタンパク質を回収する、以上a)~c) のステップを含む。

四面の簡単な説明

図式は本公開の一節を形成している。

第1図は、1文字アミノ酸残基コードを用い、左から右に、ア

トン(k)で示した見かけの分子量をもつ分子量標示物質を示している。

第5図は、15%ポリアクリルアミドゲル中で電気泳動した、因子VII/VIIIの親和性で単離したトロTFのオートフルオログラムを示している。トロTFの早期、¹²⁵Iによるラベル化及び電気泳動は、例4と同様に行った。レーンAは、DTTによる還元後の単離したトロTFを示している。レーンBは、DTT還元なしで、電気泳動した同サンプルを示している。上のバンド及び下のバンド(U及びLと表示した)は、各々、約5.8及び4.7kの大きさのトロTFに対応している。オートフルオログラフィー後、上のバンド及び下のバンドを切り出し、DTTを含むSDSサンプルバッファ中で再水和し、第2の15%アクリルアミドゲルのサンプルウェルに入れ、電気泳動した。レーンCは、レーンBから得られた、下のバンドの再電気泳動の結果を示している。レーンDは、レーンBから得られた上のバンドの再電気泳動の結果を示している。1.2.5及び4.7キログルトン(k)の見かけ上の分子量をもつタンパク質が矢印で示されている。

第6図は、例4で説明されているように、まずトロTF特異的モノクローナ抗体で免疫沈没化し、ついで8~1.7%のポリアクリルアミド匀配ゲルで電気泳動した、因子VII/VIIIの親和性で単離したトロTFのオートフルオログラムを示している。レーンAは、DTTによる還元を伴う、電気泳動した¹²⁵Iラベル化トロTFを示している。レーンBは、還元なしで電気泳動した同サンプルを示している。

第7図は、15%アクリルアミドゲル中で電気泳動した、因子VII/VIIIの親和性で単離したトロTFのオートフルオログラムを示している。単離、¹²⁵Iによるラベル化、還元及び脱グリコシ

ミノ末端からカルボニル基末端の方向で、ヒトの組織因子遺伝子タンパク質の成熟型及び前駆体(各々、トロTFと及びプレトロTF)の完全なアミノ酸残基配列を示している。主な天然の成熟型タンパク質のアミノ酸残基配列は、1番から263番に対応する。マイナーな成熟型タンパク質の配列は、3番のアミノ酸残基から始まり、263番の残基で終わる。成熟プロセスで除去されるリーダー配列(前駆体領域)に相当するアミノ酸残基配列は、マイナス番号で示した。細胞外ドメイン及びトランスマンプレン・アンカーモドは各々、部位1~219及び220~242に対応する。

第2図は、1文字スクレオチド残基コードを用い、左から右に5'末端から3'末端の方向で、プレトロTFとトロTFのタンパク質をコードする、cDNAのスクレオチド配列を示している。トロTFの構造遺伝子は塩基130から始まり、塩基918で終まる。

その読み替は、各アミノ酸を示す1文字を、対応するコドンの中央の塩基上に置くやり方で、スクレオチド配列の上に推測されるアミノ酸残基を付記することにより示した。

第3図は、例2で説明されている、トロTFの凝血活性を測定するのに用いる、凝血活性を示す図である。四対数プロットは、サビミリリットル当りのピコグラムで表わしたヒトの組織因子(トロTF)濃度で示される、ヒトのクエン酸化血凝固(凝血)時間を示したものである。

第4図は、10%ポリアクリルアミドゲル中で電気泳動した、因子VII/VIII親和性で単離したトロTFのオートフルオログラムを示している。レーンAは、例4で説明されているように、単離され、電気泳動前に、ジチオスレイトール(DTT)で還元した¹²⁵Iラベル化トロTFを示している。レーンBは、キログル

ル化は、例4で説明されているように行った。レーン1は、キログルトンで表わされた見かけ上の分子量をもつ標準物質として電気泳動したタンパク質標準物質:リゾチーム、14.3;カルボニック・アンヒドライゼ、30.0;オバルブミン、46.0;ウシ血清アルブミン、69.0;ホスホリラーゼb、92.5;ミオシン、200.0(すべてM.A.州、アーリントンハイツ・マーシャム社より入手)を示している。¹²⁵I-トロTFを含むサンプルをDTT存在下(レーン2及び3)又は非存在下(レーン4及び5)で電気泳動した。これら¹²⁵I-トロTF含有サンプルのいくつかは電気泳動前に脱グリコシル化し(レーン3及び4)、他のものは脱グリコシル化しなかった(レーン2及び5)。

レーン3及び5に流した¹²⁵I-トロTF含有サンプルは、電気泳動前に脱グリコシル化され、レーン2及び4のものは脱グリコシル化しなかった。

第8図は、例9で説明されているように、10%のポリアクリルアミドゲル中で電気泳動した、免疫親和性で単離されたトロTFのオートフルオログラムを示している。レーン1は、キログルトンで表わされた見かけ上の分子量をもつ、マーカーとして電気泳動した標準タンパク質:チトクロムC、12.4;ラクトグロブリン、18.4;カルボニック・アンヒドライゼ、29.0;ラクテート・デヒドロゲナーゼ、35.0;オバルブミン、43.0;グルタメート・デヒドロゲナーゼ、55.0;及びホスホリラーゼb、95.5(全て、M.A.州ニュートンセンターのディバーシティ・バイオテク(Diversified Biotech.)から入手した)を含んでいる。

レーン2は、スマス(Smith)等のBCAタンパク質検定法(アナリティカル・バイオケミストリー(A anal. biochem.)150巻、76~85頁(1985年))を用いて測定し、かつDTT

平成 7.12.20 発行

を用いて還元した約2.0μgのタンパク質を含んでいる。h u T F 重鎖(h u T F h)は、明らかに、およそ12.5M_rの位置に確認され、トロ T F軽鎖は、およそ12.5M_rの位置にわずかに確認された。タンパク質は、レムリ(Lemli)(ネイチャー(Nature), 227卷, 680~685頁(1970))の報告に従がい、コマージ-ブルー染色により可視化した。

第9図は、h u T F hの非リン脂質化(非脂質化)ポリペプチド類似物による、h u T F由來の凝集開始阻害の投与-応答曲線を示すグラフである。種々の濃度の非脂質化ポリペプチドによる凝集阻害率は、例12に説明されているように測定した。テストしたポリペプチドは、p 26-49(△TF26,49)、p 121-155(○, TF121,155)、p 146-167(●, TF146,167)及びp 204-226(■, TF204,226)である。

第10図は、h u T F hのリン脂質化した(脂質化した)ポリペプチド類似物による、h u T F由來の凝集開始阻害に関する投与-応答曲線を示すグラフである。その阻害率は例9で説明されているように、両類似物に対して測定した。

第11図は、組換えDNAプラスミドp CTF6'4、p CTF3'14及びp CTF4'03内のEcoRI断片挿入物の制限地図を示したものである。その挿入物(—)は、ブレットTFと遺伝子の完全なスクレオチド配列に対応する重複するスクレオチド配列領域を示している。別に、その挿入物は、第2図で示されている、残基1~486(p CTF6'4に含まれている)、残基135~775(p CTF3'14に含まれている)、及び残基776~1125(p CTF4'03に含まれている)由來のスクレオチドに対応するスクレオチド配列を、左から右に5'から

例19に述べられているように測定した。白丸(○)はTF8-5G9抗体を示し、黒丸(●)は無関係な抗体を示している。

第16図は、抗TFモノクローナル抗体TF8-5G9による精製したヒトの脳TFの凝血活性の阻害を示している。リン脂質ベシクル中に再構成された、精製したヒトの脳TFの凝血活性は、種々の濃度の精製IgGと、37℃30分間、前処理した後測定した。丸は、抗TF抗体TF8-5G9に対するもので、三角は、無関係なコントロール抗体PAb100に対するものである。データは、抗体を加えない場合の活性に対する阻害率として表わされている。

第17図は、精製した抗TFモノクローナル抗体で処理した、培養されたJ82膀胱がん細胞に対する阻害因子X_aの結合及び、その結合による因子X_aの形成を示している。因子X_aの形成率の阻害の値は、三角で表わされ、因子X_aの結合阻害の値は、丸で表わされている。データは、抗体を加えないインキュベートした細胞を用いて得られる値に対する阻害率で表現されている。パネルAは抗体TF9-2C4の効果、パネルBは、抗体TF9-5B7の効果を示している。

第18図は、例25で述べられているような、免疫親和性で草薙したh u T Fのウェスタンプロット分析を示している。15%ポリアクリルアミドゲルに次に示すものがかけられた。レーン1は、キロダルトン(k)でパネルAの左に示された見かけの分子量をもつ分子量標準が含まれる。レーン2は、電気泳動前に還元された、精製ヒトヘモグロビン1μgを含んでいる。レーン3は、草薙したh u T Fを電気泳動前に還元したもの0.5μgを含んでいる。レーン4は、非還元の、草薙されたh u T F 0.5μgを含んでいる。SDS-PAGE後、生じたタンパク質バンドを電気

3°の方向で走らせる。また、例16で述べられている種々の組換えDNA分子を検査するのに用いられた神戸大内の制限酵素切削部位のおよその位置も示されている。さらに、完全な形で示されるリードーベブチド(■)及びトランスマンプレン・アンカードメイン(▲)をもつブレットTF hタンパク質のおよその位置も示してある。

第12図は、h u T F hの非リン脂質化(非脂質化)ポリペプチド類似物による、h u T F由來の凝集開始の阻害を示す、投与-応答曲線のグラフである。モル濃度で表わした種々の濃度の非脂質化ポリペプチドによる凝集の阻害率(%)は、例12に述べられているように測定した。試験したポリペプチドは、p 26-35(△)、p 26-49(○)、p 152-169(□)及びペプチドp 40~71、p 72~104、p 94~123及びp 161~189であるがこれらは全て、実質的な阻害を示さず、集約的に黒丸(●)で示した。

第13図は、TF8-5G9抗体組成物による凝集阻害の濃度を示すグラフである。凝集の阻害率(%)は、例18で述べられているように測定された種々の抗体免疫反応時間にわたってプロットしてある。

第14図は、h u T F由來の凝集の抗h u T F抗体による阻害の投与-応答を示すグラフである。種々の濃度の抗h u T Fモノクローナル抗体TF8-5G9による凝集の阻害率(%)は例19に述べられているように測定した。

第15図は、h u T F源がヒトの細胞芽細胞系列GM1381の細胞破壊物である、h u T F由來の凝集の、抗h u T F抗体による阻害の投与-応答のグラフである。種々の濃度の抗h u T Fモノクローナル抗体TF8-5G9による凝集の阻害率(%)は、

泳動的にニトロセルロースに移した。このようにして作ったウエスタン・プロットを0.2μg/mの親和性精製したウサギ抗h u T F IgG(パネルA)、1μg/mのウサギ抗ヘモグロビンIgG(パネルB)又は、1μg/mの非免疫ウサギIgG(パネルC)と免疫反応させた。免疫染色したバンドの見かけの分子量を右にkDaで示した。

発明の詳細な説明

A. 定義

アミノ酸：ここで同定される全てのアミノ酸は、天然のL型のものである。標準的ポリペプチド命名法に従がい(ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.)、243巻、3557~359頁(1969))、アミノ酸残基の略号は、次の附表に示されているとおりである。

附表

記号	アミノ酸
I	アラニン
V	バリン
C	セレン
S	セリン
P	スレオニン
T	スレオニン
G	グリシン
D	アスパラギン
H	アスパラギン酸
R	リジン
K	リジン
W	トリプトファン
F	フェニルアラニン
M	メチオニン
Y	テロシン
N	ノニオニン
E	アスパラギン酸
Q	アスパラギン酸
L	イソロイシン
A	アラニン
D	アスパラギン
S	セリン
P	スレオニン
T	スレオニン
G	グリシン
C	セレン
V	バリン
I	アラニン
M	メチオニン
W	トリプトファン
F	フェニルアラニン
Y	テロシン
N	ノニオニン
E	アスパラギン酸
Q	アスパラギン酸
L	イソロイシン
A	アラニン
D	アスパラギン
S	セリン
P	スレオニン
T	スレオニン
G	グリシン
C	セレン
V	バリン
I	アラニン
M	メチオニン
W	トリプトファン
F	フェニルアラニン
Y	テロシン
N	ノニオニン
E	アスパラギン酸
Q	アスパラギン酸
L	イソロイシン
A	アラニン
D	アスパラギン
S	セリン
P	スレオニン
T	スレオニン
G	グリシン
C	セレン
V	バリン
I	アラニン
M	メチオニン
W	トリプトファン
F	フェニルアラニン
Y	テロシン
N	ノニオニン
E	アスパラギン酸
Q	アスパラギン酸
L	イソロイシン
A	アラニン
D	アスパラギン
S	セリン
P	スレオニン
T	スレオニン
G	グリシン
C	セレン
V	バリン
I	アラニン
M	メチオニン
W	トリプトファン
F	フェニルアラニン
Y	テロシン
N	ノニオニン
E	アスパラギン酸
Q	アスパラギン酸
L	イソロイシン
A	アラニン
D	アスパラギン
S	セリン
P	スレオニン
T	スレオニン
G	グリシン
C	セレン
V	バリン
I	アラニン
M	メチオニン
W	トリプトファン
F	フェニルアラニン
Y	テロシン
N	ノニオニン
E	アスパラギン酸
Q	アスパラギン酸
L	イソロイシン
A	アラニン
D	アスパラギン
S	セリン
P	スレオニン
T	スレオニン
G	グリシン
C	セレン
V	バリン
I	アラニン
M	メチオニン
W	トリプトファン
F	フェニルアラニン
Y	テロシン
N	ノニオニン
E	アスパラギン酸
Q	アスパラギン酸
L	イソロイシン
A	アラニン
D	アスパラギン
S	セリン
P	スレオニン
T	スレオニン
G	グリシン
C	セレン
V	バリン
I	アラニン
M	メチオニン
W	トリプトファン
F	フェニルアラニン
Y	テロシン
N	ノニオニン
E	アスパラギン酸
Q	アスパラギン酸
L	イソロイシン
A	アラニン
D	アスパラギン
S	セリン
P	スレオニン
T	スレオニン
G	グリシン
C	セレン
V	バリン
I	アラニン
M	メチオニン
W	トリプトファン
F	フェニルアラニン
Y	テロシン
N	ノニオニン
E	アスパラギン酸
Q	アスパラギン酸
L	イソロイシン
A	アラニン
D	アスパラギン
S	セリン
P	スレオニン
T	スレオニン
G	グリシン
C	セレン
V	バリン
I	アラニン
M	メチオニン
W	トリプトファン
F	フェニルアラニン
Y	テロシン
N	ノニオニン
E	アスパラギン酸
Q	アスパラギン酸
L	イソロイシン
A	アラニン
D	アスパラギン
S	セリン
P	スレオニン
T	スレオニン
G	グリシン
C	セレン
V	バリン
I	アラニン
M	メチオニン
W	トリプトファン
F	フェニルアラニン
Y	テロシン
N	ノニオニン
E	アスパラギン酸
Q	アスパラギン酸
L	イソロイシン
A	アラニン
D	アスパラギン
S	セリン
P	スレオニン
T	スレオニン
G	グリシン
C	セレン
V	バリン
I	アラニン
M	メチオニン
W	トリプトファン
F	フェニルアラニン
Y	テロシン
N	ノニオニン
E	アスパラギン酸
Q	アスパラギン酸
L	イソロイシン
A	アラニン
D	アスパラギン
S	セリン
P	スレオニン
T	スレオニン
G	グリシン
C	セレン
V	バリン
I	アラニン
M	メチオニン
W	トリプトファン
F	フェニルアラニン
Y	テロシン
N	ノニオニン
E	アスパラギン酸
Q	アスパラギン酸
L	イソロイシン
A	アラニン
D	アスパラギン
S	セリン
P	スレオニン
T	スレオニン
G	グリシン
C	セレン
V	バリン
I	アラニン
M	メチオニン
W	トリプトファン
F	フェニルアラニン
Y	テロシン
N	ノニオニン
E	アスパラギン酸
Q	アスパラギン酸
L	イソロイシン
A	アラニン
D	アスパラギン
S	セリン
P	スレオニン
T	スレオニン
G	グリシン
C	セレン
V	バリン
I	アラニン
M	メチオニン
W	トリプトファン
F	フェニルアラニン
Y	テロシン
N	ノニオニン
E	アスパラギン酸
Q	アスパラギン酸
L	イソロイシン
A	アラニン
D	アスパラギン
S	セリン
P	スレオニン
T	スレオニン
G	グリシン
C	セレン
V	バリン
I	アラニン
M	メチオニン
W	トリプトファン
F	フェニルアラニン
Y	テロシン
N	ノニオニン
E	アスパラギン酸
Q	アスパラギン酸
L	イソロイシン
A	アラニン
D	アスパラギン
S	セリン
P	スレオニン
T	スレオニン
G	グリシン
C	セレン
V	バリン
I	アラニン
M	メチオニン
W	トリプトファン
F	フェニルアラニン
Y	テロシン
N	ノニオニン
E	アスパラギン酸
Q	アスパラギン酸
L	イソロイシン
A	アラニン
D	アスパラギン
S	セリン
P	スレオニン
T	スレオニン
G	グリシン
C	セレン
V	バリン
I	アラニン
M	メチオニン
W	トリプトファン
F	フェニルアラニン
Y	テロシン
N	ノニオニン
E	アスパラギン酸
Q	アスパラギン酸
L	イソロイシン
A	アラニン
D	アスパラギン
S	セリン
P	スレオニン
T	スレオニン
G	グリシン
C	セレン
V	バリン
I	アラニン
M	メチオニン
W	トリプトファン
F	フェニルアラニン
Y	テロシン
N	ノニオニン
E	アスパラギン酸
Q	アスパラギン酸
L	イソロイシン
A	アラニン
D	アスパラギン
S	セリン
P	スレオニン
T	スレオニン
G	グリシン
C	セレン
V	バリン
I	アラニン
M	メチオニン
W	トリプトファン
F	フェニルアラニン
Y	テロシン
N	ノニオニン
E	アスパラギン酸
Q	アスパラギン酸
L	イソロイシン
A	アラニン
D	アスパラギン
S	セリン
P	スレオニン
T	スレオニン
G	グリシン
C	セレン
V	バリン
I	アラニン
M	メチオニン
W	トリプトファン
F	フェニルアラニン
Y	テロシン
N	ノニオニン
E	アスパラギン酸
Q	アスパラギン酸
L	イソロイシン
A	アラニン
D	アスパラギン
S	セリン
P	スレオニン
T	スレオニン
G	グリシン
C	セレン
V	バリン
I	アラニン
M	メチオニン
W	トリプトファン
F	フェニルアラニン
Y	テロシン
N	ノニオニン
E	アスパラギン酸
Q	アスパラギン酸
L	イソロイシン
A	アラニン
D	アスパラギン
S	セリン
P	スレオニン
T	スレオニン
G	グリシン
C	セレン
V	バリン
I	アラニン
M	メチオニン
W	トリプトファン
F	フェニルアラニン
Y	テロシン
N	ノニオニン
E	アスパラギン酸
Q	アスパラギン酸
L	イソロイシン
A	アラニン
D	アスパラギン
S	セリン
P	スレオニン
T	スレオニン
G	グリシン
C	セレン
V	バリン
I	アラニン
M	メチオニン
W	トリプトファン
F	フェニルアラニン
Y	テロシン
N	ノニオニン
E	アスパラギン酸
Q	アスパラギン酸
L	イソロイシン
A	アラニン
D	アスパラギン
S	セリン
P	スレオニン
T	スレオニン
G	グリシン
C	セレン
V	バリン
I	アラニン
M	メチオニン
W	トリプトファン
F	フェニルアラニン
Y	テロシン
N	ノニオニン
E	アスパラギン酸
Q	アスパラギン酸
L	イソロイシン
A	アラニン
D	アスパラギン
S	セリン
P	スレオニン
T	スレオニン
G	グリシン
C	セレン
V	バリン
I	アラニン
M	メチオニン
W	トリプトファン
F	フェニルアラニン
Y	テロシン
N	ノニオニン
E	アスパラギン酸
Q	アスパラギン酸
L	イソロイシン
A	アラニン
D	アスパラギン
S	セリン
P	スレオニン
T	スレオニン
G	グリシン
C	セレン

K	Lys	リジン
H	His	グルタミン
Q	Gln	グルタミン
B	Glu	グルタミン酸
W	Trp	トリプトファン
R	Arg	アルギニン
D	Asp	アスパラギン酸
N	Asn	アスパラギン
C	Cys	システィン

ここでは、全てのアミノ酸配列は、從来どおり左から右に、アミノ酸末端からカルボキシ末端への方向で示されていることに注意を要する。さらに、アミノ酸残基配列の始め又は終りのダッシュは、各々、アミノ及びカルボキシ末端のH及びOH(冰素及び水酸基)のようなラジカルへの結合、もしくは、ポリペプチド鎖における1から約15残基の1つ以上のアミノ酸残基配列を示している。

ポリペプチド及びペプチド：ポリペプチド及びペプチドはここでは、隣合う残基のアルファアミノ基とカルボキシル基の間のペプチド結合により互いに直線的に結合した、わずか約50アミノ酸残基を意味するものとして互換的に用いられている。

タンパク質：タンパク質は、ポリペプチドのように互いに直線的に結合した50以上のアミノ酸残基を意味して用いられている。

スクレオチド；糖部分(ペントース)、リン酸及び窒素-ヘテロ環塩基からなるDNA又はRNAの單量体ユニット。この塩基はグリコシド炭素(ペントースの1'炭素)を介して糖部分と結合しており、塩基と糖の組合せはスクレオシドと呼ばれる。スクレオシドがペントースの3'又は5'部位に結合するリン酸基を含

バク質をコードする構造遺伝子を形成するDNA配列がDNA断片中に含まれることが望ましい。その遺伝子はhUTFh又はブレトUTFhタンパク質中にあるアミノ酸残基をコードする各コドンが中断することなく連続して存在する、すなわち、イントロンを含まない遺伝子であることが好ましい。

従って、第2図に示される、5'末端の約130番から、3'末端の約918番の部位の配列を基本的に含み、かつ、hUTFhを発現することができるDNA断片が本発明の1結構を構成している。第2図に示される、約34番から約918番の部位の配列を基本的に含み、かつ、ブレトUTFhを発現できるDNA断片が、本発明のもう1つの構造を構成している。

好ましい、可溶性のhUTFh分子は、hUTFhをコードするDNAの5'末端の約150塩基によってコードされるアミノ酸残基を欠いている。従って、第2図で示される、5'末端の約130番から約756番を経由して、3'末端の約801番の部位までの配列を基本的に含み、かつ、可溶性のhUTFhを発現できるDNA断片は、本発明のさらに好ましい構造を構成する。可溶性のhUTFh構造遺伝子を形成する、典型的な好ましいDNA断片は、第2図で示されている、約130番から約756番、約130番から約771番、約130番から約786番、及び約130番から約801番で表わされるスクレオチド配列を有するものである。

可溶性ブレトUTFhをコードする、好ましいDNA断片は、それらが、第1図で示されるように、-32番から0番までのアミノ酸残基で示されるような、アミノ末端リーダー配列を含むタンパク質をコードしていること以外は、可溶性hUTFhをコードしているものと同じである。従って、可溶性ブレトUTFh

平成 7.12.20 発行

むとき、それをスクレオチドと呼ぶ。

塩基対(bp)：二本鎖DNA分子内でのアデニン(A)とチミン(T)又はシトシン(C)とグアニン(G)の組合せ。

B. DNA断片

生物において、タンパク質又はポリペプチドのアミノ酸配列は遺伝子コードを介して、そのタンパク質をコードする構造遺伝子のデオキシリボ核酸(DNA)配列に直接関係づけられる。従って、構造遺伝子は、それがコードするタンパク質又はポリペプチドのアミノ酸残基配列で定義することも可能である。

重要でかつよく知られた遺伝子コードの性質にリダンダーシーがある。すなわち、タンパク質を作るのに用いられるほとんどのアミノ酸に対し、1つ以上のコードするスクレオチド・トリプレット(コドン)が、1つのアミノ酸残基をコード又は指定している。それ故、1つのアミノ酸残基配列をコードするのに多くの異なるスクレオチド配列が存在することになる。そのようなスクレオチド配列は、全ての生物において、同じアミノ酸残基配列を生成することが可能なので、確実には等価であると考えられている。場合によっては、プリン又はピリミジンのメチル化物がスクレオチド配列の中に組込まれている事もある。しかし、そのようなメチル化は、コード関係にはなら影響しない。

本発明のDNA断片は、ヒトの組織因子重複タンパク質(hUTFh)をコードするDNA配列を含むという特徴をもつ。好ましい遺伝子において、このDNA断片は、ヒトの組織因子重複前駆体タンパク質(ブレトUTFh)をコードするDNA配列を含んでいる。すなわち、本発明のDNA断片は、hUTFh、また、より好ましくは、ブレトUTFhの構造遺伝子の存在で特徴づけられる。さらに、可溶性のhUTFh又は可溶性のブレトUTFhタンパク

をコードする構造遺伝子を形成している。好ましいDNA断片は、基本的に、第2図で示されている5'末端の約34番から約756番を経由して、3'末端の約801番で示される配列を含んでいる。典型的な好ましい可溶性のブレトUTFhコードのDNA断片とは、第2図で示されているところの、約34番から約756番、約34番から約771番、約34番から約786番及び約34番から約801番のスクレオチド塩基配列を有するものである。

可溶型も含めて、上記hUTFh及びブレトUTFhタンパク質をコードする相同的DNA及びRNAも先に推論したように考案された。

hUTFh及びブレトUTFhをコードするDNA断片は化学的技術、例えばマテウシ(Matteucci)等のホスホトリエステル法(ジャーナル・オブ・アメリカン・ケミカル・ソサイアティー(J. Am. Chem. Soc.) 103巻3185頁(1981年))により容易に合成できる。(ここで引用されている技術の公開は参考として組込まれている。)もちろん、コード配列を化学的に合成することにより本来のアミノ酸残基配列をコードする代りに適当な塩基を用いることにより、いかなる修正も望みどおりにすることができる。しかし第2図に示されているものと全く相同的な配列を含むDNA分子の方が望ましい。

さらに、基本的にhUTFh及びブレトUTFhタンパク質をコードする構造遺伝子を含むDNA断片は、これらの遺伝子を含む組換えDNA分子から得ることができる、例えば、プラスミドタイプの組換えDNA分子pCTF64、pCTF314及びpCTF403はいずれもhUTFh及びブレトUTFhタンパク質の異なる領域をコードするDNA配列を含んでおり、また、これらを

平成 7.12.20 発行

合せると、各タンパク質を発現するのに必要な全てのDNA配列を有することになる。各々、pCTP64、pCTF316又はpCTP403でトランスポームした大腸菌の培養物は、1987年3月21日、ブダペスト協定に基づき、MD州、ロックビル、パークローン、ドライブ12301番、アメリカン・タイプ・カルチャーライブ・コレクション(ATCC)に保管され、各々、登録番号67370、67358及び67369が割当てられた。

hUTFh又はプレヒUTFhをコードするDNA配列を含むDNA断片は、よく知られている方法を用い、先に述べた各プラスミドからの适当的な制限断片を標的的に結合することにより作ることができる。典型的に、本方法で作られた本発明のDNA分子は、粘着末端、すなわちこの分子の二本鎖領域を離れて伸びた“突き出した”一本鎖領域をもっている。本発明のDNA分子上に粘着末端があることは望ましいことである。

本発明は、上述のDNA断片と等価なりRNA（mRNA）も考案している。

C. 組換えDNA分子

本発明の組換えDNA分子は、本発明のDNA断片をベクターに標的的に結合することにより作ることができる。

ここで用いられているように、“ベクター”という言葉は、細胞内で自己複製できるDNA分子で、別のDNA断片を標的的に結合することができ、その結合した断片の複製をもたらすものを使味する。hUTFh及びプレヒUTFh遺伝子の発現を司ることができるべきベクターは、ここでは“発現ベクター”と呼ばれる。従って、組換えDNA分子(rDNA)とは、天然においては通常一緒にいることはない少なくとも2つのスクレオチド配列を含むハイブリッドDNA分子のことである。

バイオラド・ラボラトリーズ社)及びpPL、pKK223(MJ州、ビスカタウェイ、ファルマシア社)がある。

真核細胞、好ましくは脊椎生物細胞と適合する発現ベクターも、本発明の組換えDNA分子を作るのに用いられる。真核細胞発現ベクターもこの分野でよく知られており、数社から市販されている。典型的にはこれらのベクターは、目的とするDNA断片の挿入に便利な制限部位を含んでいる。これらのベクターの典型的なものには、pSUL及びpKSV-10(ファルマシア社)、pBPV-1/pML2d(インター・ナショナルバイオテクノロジー社)及びpTDTI(ATCC, #31255)がある。

好ましい結果において、本発明の組換えDNA分子を構築するのに用いられる真核細胞発現ベクターは、真核細胞中で効果的な選択マーカー、好ましくは、薬剤耐性選択マーカーを含んでいる。好ましい薬剤耐性マーカーとは発現によりネオマイシン耐性となる遺伝子、すなわち、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ(neo)遺伝子である。サウザーン(Southern)等、ジャーナル・オブ・モレキュラー・アンド・アプライド・ジェネティクス(J. Mol. Appl. Genet.)1巻、321~341頁(1982年)。

本発明のrDNAを作るために、レトロウイルス発現ベクターの使用も考案されている。ここで用いられているように、“レトロウイルス発現ベクター”とは：レトロウイルスゲノムのロング・ターミナル・リピート(LTR)領域由来のプロモーター配列を含むDNA分子を意味する。

好ましい結果において、典型的な発現ベクターは、真核細胞中では謀要不能なレトロウイルス発現ベクターである。レトロウイルスの構築と使用法は、ソージ(Sorge)等により報告されてい

本発明のDNA断片を標的的に結合させるベクターの選択は、この分野ではよく知られているように、例えば、タンパク質の発現などの標的的性質及びトランスポームされる宿主細胞などが組換えDNA分子の構築技術の上で本質的な制限となることから、これらに直接依存する。しかし、本発明によって考案されたベクターは、これに標的的に結合しているDNA断片中に含まれるhUTFh又はプレヒUTFh遺伝子の、少なくとも複型を、好ましくは発現をも可逆にする。

好ましい結果において、本発明により考案されたベクターは、原核性のレブリコン、すなわち、バクテリア宿主細胞のような原核細胞中の、これをトランスポームした染色体外組換えDNA分子の自己複製及び維持を可能とするDNA配列を含んでいる。このようなレブリコンは、この分野ではよく知られている。さらに、原核性レブリコンを含むこれら細胞は、これをトランスポームしたバクテリア宿主に薬剤耐性を与える遺伝子も含んでいる。典型的なバクテリアの薬剤耐性遺伝子は、アンビシリン又はテトラサイクリンに対する耐性を与えるものである。

原核性レブリコンを含む、これらのベクターは、これをトランスポームした大腸菌のようなバクテリア宿主細胞中で、hUTFh又はプレヒUTFh遺伝子を発現(既存及び新規)させることができる原核性プロモーターも含んでいる。プロモーターとは、RNAポリメラーゼの結合を許し、転写を開始させる、DNA配列でできた発現コントロール要素である。バクテリア宿主と適合するプロモーター配列の典型的なものは、本発明のDNA断片の挿入に便利な制限部位を含むプラスミドベクター中に存在する。このようなベクター・プラスミドの典型的なものには、pUCB、pUC9、pBR322、pBR329(CA州、リッチャモンド、

ル(モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー(Mol. Cell. Biol.)4巻、1730~37頁(1984年)。

相補的なヌクレオツチー末端を介して、DNAをベクターに標的的に結合する多くの方法が開発されてきている。例えば、相補的なヌクレオツチーを、挿入するDNA断片及びベクターDNAに付加することができる。それから、このベクターとDNA断片を相補的なヌクレオツチー末端間の水素結合で結合し、組換えDNA分子を作る。

1つ以上の制限部位を含む合成リンクマーは、DNA断片をベクターに結合するもう1つの方法を提供する。先に報告されているように、エンドヌクレアーゼで制限消化することによって生成したDNA断片を、3'→5'エンドヌクレアーゼ活性で突出する3'、一本鎖末端を除き、また重合活性で、くばんだ3'末端を充填する酵素、バクテリオファージT4 DNAポリメラーゼ又は、大腸菌DNAポリメラーゼIで処理する。従って、これらの活性の組合せで、平滑末端DNA断片が生ずる。それから、この平滑末端DNA断片を、バクテリオファージT4 DNAリガーゼのような、平滑末端DNA分子のライゲーションを触媒することができる酵素の存在下、大過剰のリンクマー分子とインキュベーションする。このような反応でその末端にポリリンクマーをもつDNA断片ができる。さらにこのDNA断片を適当な制限酵素で切断し、このDNA断片と適合する末端を作る酵素で切断した発現ベクターとライゲーションする。

多様の制限エンドヌクレアーゼ部位を含む合成リンクマーは、CN州ニュー・ヘブン、インターナショナル・バイオテクノロジー社を含む多くの会社から市販されている。

本発明は、上述の組換えDNA分子と等価なRNAも考案して

平成 7.12.20 発行

年)、グラハム(Graham)等、ウイロロジー(Virology), 52巻、455頁(1973年); 及びウィグラー(Wigler)等、プロジェクトディング・イン・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 76巻, 1373~75頁(1979年)を参照せよ。

うなぐトランスホームされた細胞、すなわち、本発明の組換えDNA分子を含む細胞は、従来の方法によって同定することができる。例えば、本発明のrDNAの導入から生じた細胞をクローニングし、モノクローナルコロニーを作る。これらのコロニーから細胞を収穫し、溶解し、そのDNA内容物について、サウザーン(Southern) (ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(J. Mol. Biol.), 98巻, 503頁(1975年)又は、ペレント(Borrel)等(バイオテクノロジー(BioTechn.), 3巻, 208頁(1985年)によって報告されている方法を用いて、そのrDNAの存在を調べた。

rDNA存在の直接的検定に加え、成功したトランスホームーションは、そのrDNAがhUTFh又はプレhUTFhを発現することができるときは、従来の免疫学的方法で確かめることができる。例えば、発現ベクターでうまくトランスホームーションできた細胞は、hUTFh又はプレhUTFh抗原性を示すタンパク質を生産する。トランスホームさせた細胞試料を収穫し、本発明のハイブリドーマによって生産される抗原等に特異的な抗体を用い、hUTFh又はプレhUTFhを検定する。

このように、トランスホームした宿主細胞それ自身に加え、本発明は、栄養培地中のそれらの細胞の培養物好ましくは、モノクローナル(クローニング的に均一な)培養物、又は、モノクローナル培養物由来の培養物も考慮した。この培養物は、hUTFh又は

いる。

D. トランスホームした細胞と培養

本発明は、本発明の組換えDNA分子、好ましくは可溶性のhUTFh又はプレhUTFhを発現できるrDNAでトランスホームした宿主細胞にも関連している。この宿主細胞は、原核性でも真核性でもよい。バクテリア細胞は、原核宿主細胞であることが好ましく、また典型的には、ND州ベセスダ、ベセスダ・リサーチラボラトリーズ社から入手できる大腸菌DH5株のような、大腸菌の株である。好ましい真核性宿主細胞には、イースト及びホモ乳頭細胞、好ましくはマウス、ラット、サル又はヒトの培養芽胞型系列のような脊椎動物細胞が含まれる。好ましい真核性宿主細胞には、CCL61としてATCCから入手できるチャイニーズ・ハムスターの卵巣(CHO)細胞及びCRL1658としてATCCから入手できるNIHスイスマウス胚細胞がある。

本発明の組換えDNAによる通常な細胞宿主のトランスホームーションは、典型的には用いるベクターのタイプに応じて、よく知られている方法により行なわれる。例えば、原核性宿主細胞のトランスマーチョンに関しては、コーエン(Cohen)等のプロジェクトディング・イン・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 69巻, 2110頁(1972年); 及びマニアチス(Manatis)等のNY州コールド・スプリング・ハーバー・コールド・スプリングハーバー・ラボラトリ、ラボラトリ、マニュアル、モレキュラー・クローニングを参照せよ。脊椎動物細胞のrDNAを含むレトロウイルス・ベクターによるトランスマーチョンに関しては、例えば、ソージ(Sorge)等、モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー(Mol. Cell. Biol.)4巻, L730~37頁(1984)

プレhUTFh抗原性を示すタンパク質、またさらに好ましくは、生物学的に活性なhUTFhを含むことが望ましい。

トランスマーチムした宿主細胞を培養するのに有用な栄養培地は当分野ではよく知られており、また、いくつかの販売会社より市販されている。宿主細胞がホモ乳頭細胞であるような場合には、「無血清」培地を使うことが望ましい。

E. hUTFh及びプレhUTFhタンパク質の生産方法

本発明の別の特徴には、hUTFh抗原性を示すタンパク質の生産方法がある。hUTFh抗原性を示すタンパク質は天然の組換え因子によって誘導される抗体を免疫反応を起こすタンパク質である。hUTFh抗原性を示すタンパク質は、抗原として有用であり、又、抗体を生じさせるときにも有用で、その各々が本発明の診断システムや診断法で使用することができる。

本方法は、hUTFh又はプレhUTFh、好ましくは可溶性のhUTFh又は可溶性のプレhUTFhを発現することができる。本発明の組換えDNA分子でトランスマーチムした宿主細胞、好ましくは、ヒトの細胞を含有する栄養培地を含む培養の開始する。この培養を、そのトランスマーチムした細胞がhUTFh又はプレhUTFhタンパク質を発現するのに十分な時間維持する。発現したタンパク質をその培地から回収する。好ましい培地において、本発明の方法によって作られたhUTFh分子とタシパク質はさらにhUTFhの生物学的活性すなわち、因子VII/VIIIと結合する能力を示す。これらの方法は、宿主細胞においてプレhUTFh遺伝子を発現できる組換えDNA分子でトランスマーチムしたホモ乳頭宿主細胞の培養を含んでいる。その培養により、プレhUTFhタンパク質が発現し、つづいて、そのプレhUTFhの細胞内で翻訳後の修正が起こり、生物学的に活性のあるhUTFhタン

パク質が生じる。

培養物から、発現したタンパク質を回収する方法は、当分野ではよく知られたことであり、従来の生化学的方法を用い、その培養物のタンパク質含有百分比の分率が含まれる。例えば、タンパク質の分率に対して知られているゲル沈降法、ゲルクロマトグラフィー、アフィニティ・クロマトグラフィー及びそれに類するものが、培養物中にある発現タンパク質の単離に用いることができる。さらに、免疫吸着、免疫吸着やそれに類するもののような、免疫化学的方法も、従来法を用いて行なわれる。

F. hUTFh及びプレhUTFhタンパク質組成物と発現産物

本発明は、また本発明のrDNAのhUTFh及びプレhUTFhタンパク質発現産物も考慮している。好ましい組織において、hUTFh及びプレhUTFh発現産物は第1図で示されているように、各々残基1から263及び-32から263に対応するアミノ酸残基を有している。その発現タンパク質は、第1図で示されるプレhUTFh及びhUTFhのアミノ酸残基配列の長さの少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%であることが望ましい。

別の組織において、可溶型のhUTFh及びプレhUTFhと、可溶性hUTFhそして、または可溶性プレhUTFhを含む組成物も考慮されている。ここで用いている「可溶性」という言葉は、本来のhUTFh及びプレhUTFh分子の細胞外ドメイン、すなわち、第1図に示すところのアミノ末端から残基220までの、hUTFh及びプレhUTFh分子領域を基本的に含むことを特徴とするhUTFh及びプレhUTFh分子を意味する。それゆえ、可溶性hUTFh及び可溶性プレhUTFhは、本来の分子で形成されるトランスマンプレン・アンカー領域の実質的部

平成 7.12.20 発行

1図で示すところの約-32番から214番、約-32番から219番、及び約-32番から約224番の残基で表わされるアミノ酸残基配列を有するものである。

1つの態様において、 huTFh 及び prehuTFh 発生物はグリコシル化されていない。すなわち、それらは、本発明のrDNAでトランスフォームした原核細胞中で生産される。

非グリコシル化型の huTFh 及び prehuTFh は、本発明の接種物及び診断システムにおける抗原及び抗原として有用である。

典型的には、直接細胞で生産された huTFh 及び prehuTFh はグリコシル化されており、また抗原性及び免疫原性に加えて、生物学的活性を有する。ここで用いられているように、“生物学的活性”という語句は、因子W/W₂の依存の凝集を誘導する能力をもつ huTFh 又は prehuTFh タンパク質又はポリペプチドを指して使われる。

このように、本発明は、実質的にヒトの組織因子絆原タンパク質を含まない生物学的に活性な huTFh を含有する水溶液を含む組成物を考察している。その組成物も実質的に例えばラウリル硫酸ナトリウム等のイオン性界面活性剤、ポリアクリルアミド及びSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)で測定される約、15000ダルトン以下の見かけの分子量を有する組織由来のタンパク質のような物質を含まないことが望ましい。

水溶性の huTFh 含有溶液は血液又はクエン酸化した血漿のような血液由来の物質のような血清系液状サンプルの凝集能力を検定するのに十分な生物学的活性のある huTFh を含んでいる。“凝集能力”という語句は生物学的に活性な huTFh 存在

分(第1図で示すところの残基220から242)を含まない。ここで用いている“ huTFh ”及び“ prehuTFh ”という言葉は今後特にことわらないかぎり、そのタンパク質の可溶型を含んでいる。

可溶性の huTFh 及び可溶性グレトロTFHは、疏水的なトランスメンブレン・アンカー領域を含んでいないので、これらは、生理学的に許容される水溶液中で実質的に凝集することはない。それゆえ、可溶性の huTFh 及び可溶性の prehuTFh は、存在する huTFh 又は prehuTFh タンパク質の少なくとも約70%、好ましくは約80%、そしてより好ましくは約90%（重量ペーセント）が非凝聚（单量体）型であり、タンパク質濃度約0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ から約1.00 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の生理学的に許容された希釈剤を用いた水溶液を作りうることを特徴とする。タンパク質溶液中に存在する高濃度の測定法は、当分野ではよく知られているところであり、詳説カラムクロマトグラフィーによるサイズ分離を含んでいる。

好ましい可溶性 huTFh タンパク質は第1図で示されているところの、アミノ末端の残基約1番から、209番を経由してカルボキシ末端の残基224番で示されるアミノ酸残基を示している。従って、好ましい可溶性 huTFh タンパク質は第1図で示すところの約1番から約209番、約1番から約219番及び約1番から約224番の残基で表わされるアミノ酸残基配列を有するものである。

好ましい可溶性 prehuTFh タンパク質は、第1図で示すところの、アミノ末端の-32番から、209番を経由して、カルボキシ末端の224番の残基で表わされるアミノ酸残基を示している。従って、好ましい可溶性 prehuTFh タンパク質は、第

下、血管系液状サンプルを凝集する能力を意味する。凝集能力を検定するのに十分な、典型的 huTFh タンパク質濃度は、例2におけるサンプル/ huTFh 比と同じ比を用いたとき、約0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ から約1.00 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは、約1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ から約10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、そしてより好ましくは約10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ から約1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ である。もちろん、凝集能力を検定するときに必要な濃度よりも高い濃度であるが、好ましい濃度に先駆しうる huTFh 溶液も考慮されている。

好ましい態様において、 huTFh 含有溶液は、リン脂質又は非イオン性界面活性剤中に分散された huTFh を含んでいる。典型的リン脂質： huTFh タンパク質質量比は、約5：1から12000：1、好ましくは、約50：1から約5000：1そしてさらに好ましくは、約100：1から2500：1の範囲である。

G. ポリペプチド

本発明の各ポリペプチドは、せいぜい約50個、より通常には約35個以下の、そして好ましくは約25個以下のアミノ酸残基を含んでおり、かつ、少なくとも10個の残基を含んでいる。さらに、本発明のポリペプチドは、そのアミノ酸残基配列及び新しい機能特性を特徴としている。

従って、本発明のポリペプチドの1つの態様は、血液凝集因子W/W₂への huTFh の結合を競合的に阻害する能力をその特徴の1部としている。 huTFh 結合部位ポリペプチド類似物である。本発明の結合部位類似物は活性化した複合体を作ることなく、すなわち、凝集を開始することなく因子W/W₂に結合することが望ましい。

ここで用いている“複合体”という言葉は、抗原-抗体又は、

-VNQVYTT-

を含んでいる。

さらによましくは、 huTFh 結合部位類似物は、少なくとも次のアミノ酸残基配列：

-VNQVYTVQIST-

-LYYWKKSSSGKKT-

のうちの1つを含んでいる。

これらの配列は、第1図で示すところの各々、30~4.0及び155~167番の、 huTFh のアミノ酸残基を示している。

さらに一度よましい場合は、 huTFh 結合部位類似物は第1図で示すところの、各々26~49番及び146~167番で表わされている、次のアミノ酸残基配列：

-EPKPVWVQVTVQISTKSCDKHNSIC-, 及び

-VFGKDLYITLTYWKSSSSGKKT-,

からなる群から選ばれたアミノ酸残基配列を含む。

好ましい huTFh 結合部位ポリペプチド類似物は第1表で示されているアミノ酸残基配列を含んでいる。

平成 7.12.20 発行

ン残基を示している。

本発明のポリペプチドは、そのポリペプチドが因子H/Huへ結合に対し、本来の組合因子と競合でき、そして、または、HuTFHに対する抗体とTFH抗体分子の結合を競合的に阻害しうるかぎり、HuTFHのアミノ酸残基配列と同一である必要がないことを理解すべきである。それ故、本ポリペプチドは、使用する際に有利となるような、保存的、非保存的にかかわらず導入、欠失及び置換のような種々の変化を与えることができる。

保存的置換には、あるアミノ酸残基が他の生物学的に同様の残基に置き換ったものである。保存的置換の例には、イソロイシン、バリン、ロイシン又はメチオニンのような疏水的残基間の置換又は、アルギニンとリジン、グルタミン酸とアスパラギン酸又はグルタミンとアスパラギン及びそれに類するもののような酸性残基間の置換がある。また“保存的置換”という語句には、もし、ポリペプチドが、必要とされる結合活性を示すならば、未置換の元々のアミノ酸の代りに、置換されたアミノ酸を置くことも含まれれる。

本発明のポリペプチドが、1つ以上の保存的、もしくは非保存的置換をしているために、本来のHuTFHの配列と同一ではない場合、本発明のポリペプチドがラベル又は固体マトリックス、又はキャリヤーにうまく固定する“リンク”を提供する目的で、その各末端に付加的残基をつけ加える場合は別にして、アミノ酸残基の通常せいぜい約20パーセント、より普通には、せいぜい10%が置換している。本発明のポリペプチドと共に使用されるラベル、固体マトリックス及びキャリヤーは以下に述べる。

通常、アミノ酸残基リンクは、少なくとも1残基であり、また40以上の残基のこともあり、しばしば1~10残基が用いら

第1表

アミノ酸残基配列

p24-35	H-EWDPKPKVIIQVYTT-OR
p26-49	H-EPKPKVNIQVYTYVQ15TAKSGDWSKSC-OH
p344-159	H-RDVFGKDLIYTLYYYK-OH
p146-167	H-VFGKDLIYTLYYYKSSSSGKXK-OH
p159-169	H-ITTYLWKS55GKXTAK-OH
P157-169	H-YKSSSSGKXTAK-OH
p161-189	H-ESSGKXTAXTNTTHEFLIDVDKGEMYCFSV-OH

・ 各ポリペプチドの実験名は第1図の、含まれているアミノ酸残基配列を表わしている。

ポリペプチド p 2 6 ~ 4 8 、 p 1 4 6 ~ 1 6 7 及び p 1 6 1 ~ 1 8 9 も、抗体と HuTFH 抗体分子が HuTFH に結合するのを中和（競争的阻害）する能力を特徴としている。抗体と HuTFH 抗体の HuTFH への結合を中和する能力をもつ本発明の他のポリペプチドは、第2表に示されているものである。

第2表

アミノ酸残基配列

p1-30	H-SGTINTVAAYNLJWYSTHKTILEWEPKPV-OH
p40-71	H-TKSGDWKSKCFCYTTIDTECOLTDEIVKDVXQTY-OH
p41-69	H-KSGDWKSKC-OH
p36-71	H-ECDLTDEIVKDVXQTY-OH
p72-104C*	H-LARUVFSYPAHVVESTGSACSEPLYZNSPEFTPYLC-OH
p94-123	H-YENSPFPTTPYLETILQGPTIQS5F2QVGTRV-OH
p190-209	H-QAVIPSPATVNRKSTDSPVSC-OH

・ 実験名に付けられた“C”は、タンパク質結合のためのリンクとして、示されている配列に付け加えられたシスティ

れる。リンクングに使われる典型的アミノ酸残基は、チロシン、システイン、リジン、グルタミン酸及びアスパラギン酸とそれに類するものである。さらに、本発明のポリペプチドは、未縮合、アシル化、例えばアセチレーショーン又はオクタグリコン酸アミデーション、クーミナルカルボキシアミデーション、例えば、アンモニア、メチルアミン、その他により配列が修飾を受けていることで、天然の配列とは異なることがある。

キャリヤー・ヘテシンのように、当分野でよく知られているリンクを介してのキャリヤーとの結合の場合、本発明のポリペプチドは、HuTFHと免疫反応する抗体を誘導することができる。免疫学的な交叉反応性の明白な原則からみて、本発明は、第1表及び第2表で示されているポリペプチドの抗原的に関連したバリエントも考慮している。“抗原的に関連したバリエント”とは、第1表もしくは第2表のポリペプチドの、少なくとも6個のアミノ酸残基配列領域を含み、かつ、第1表又は第2表のポリペプチド及びHuTFHと免疫反応を起こす抗体分子を誘導することができるポリペプチドのことである。

また、ポリペプチドがリン脂質又は非イオン性界面活性剤中に分散した、HuTFH結合部位ポリペプチド類似物の水性溶液を含む組成物を、本発明は考慮している。典型的なリン脂質：ポリペプチド重量比は、約5:1から200:1、好ましくは約30:1~80:1、さらによくは、約45:1~55:1の範囲にある。リン脂質中に分散して使用するのに適している好ましいHuTFH結合部位類似物をセクション④の第4表にリストした。

本発明のポリペプチドは、ポリペプチドの分野ではよく知られているいくつかの方法で合成することができる。使用しうる多くの技術のすぐれたまとめは、J. H. 施トワード (Steward) 及び

J. B. ヤング (Young) の“固相ペプチド合成” (1969年、サンフランシスコ、H. B. フリーマン (Freeman) 社) 及び J. メイエンホーファー (Melenhofer) の“ホルモン性タンパク質及びペプチド” (1983年、アカデミックプレス社 (ニューヨーク) 、2版、46頁) が固相ペプチド合成について、またJ. シュローダー (Schroeder) とK. クブケ (Kubke) の“ペプチド” (1965年、アカデミックプレス社 (ニューヨーク) 1巻) が古典的な液相法について詳しく述べている。

K. 接種物

別の観点において、本発明のポリペプチド又は、その抗原的に関連したバリエントは、生理学的に許容しうる水性粘稠組成物として、その効果的量が投与された時、HuTFHと免疫反応する抗体を誘導することができる接種物となる。種々の文法型の“接種物”という語は、HuTFHに対する抗体の固形に用いられる活性成分として、本発明のポリペプチドを含む組成物として、ここで使用されている。ポリペプチドの抗体を誘導するのに用いられるとき、そのポリペプチドは、単独で、又は結合体としてキャリヤーと結合して、又は、ポリペプチド結合体として用いられるのであるが、表現の簡便性のため、本発明のポリペプチドの種々の態様は、全て、“ポリペプチド”という語及びその種々の文法型で呼ばれていることを理解されよう。

約35以下のアミノ酸残基を含むポリペプチドに対し、すでに記されているように抗体生産の誘導のためには、キャリヤーに結合したペプチドを使用する方が望ましい。

すでに記してきたように、1つ以上の付加的アミノ酸残基をポリペプチドのキャリヤーへの結合を助けるため、そのポリペプチドのアミノ又はカルボキシ末端に付加することができる。ポリベ

平成 7.12.20 発行

アチドのアミン又はカルボキシ末端へ付加したシスティン残基は、ジスルフィド結合を介して、結合体を作るのに特に有用であることが分っている。しかし、結合体を調製の当分野でよく知られている他の方法も使用しうる。代表的付加結合法にはミカエル付加反応物、グルタルアルデヒドのようなジアルデヒド（クリプスタイン（Klipstein）等（ジャーナル・オブ・インフェクションズ・ディジー（J. Infect. Dis.））、147巻、318～326頁、（1983年））及びそれに類するものの使用、又は、キャリヤーに対し、アミド結合を生ずる、水溶性カルボジイミドの使用よう、カルボジイミド法の使用が含まれる。活性官能基を介してのタンパク質の結合については、オーラメアス（Auramess）等のスカンジナビアン・ジャーナル・オブ・イムノロジー（Scand. J. Immunol.）8巻、第1、7、7～23頁（1978年）を参照せよ。

有用なキャリヤーは、当分野ではよく知られており、一般的にはタンパク質そのものである。そのようなキャリヤーの代表例としては、キーホール、リンペット、ヘモシアニン（XLH）、エヌチシ、チログロビン、子ウシ血清アルブミン（BSA）やヒト血清アルブミン（HSA）のようなアルブミン類、ヤギ赤血球（SRBC）のような赤血球類、テナストキソイド、コレラトキソイド、ヨリ（D-リジン：D-グルタミン酸）のようなポリアミノ酸及びこれに類するものがある。

キャリヤーの選択は、その接種物の最終的使用法に依存しており、本発明に特に固有しない基準に基づいている。例えば、接種される動物中で不適合な反応を起こさないキャリヤーが選択されるべきである。

本発明の接種物は、典型的には、キャリヤーに結合した結合物

及びイムノグロブリン分子の免疫学的に活性な領域すなわち抗体結合部位又はペラトープを含む分子を意味する。代表的抗体分子には、本来のイムノグロブリン分子、実質的に本来のものと同じイムノグロブリン分子及びFab、Fab'、F(ab')_n及びF(v)として、当分野で知られている領域を含む、ペラトープを含有する、イムノグロブリン分子の一部がある。

本発明の抗体組成物は、huTFP_n及び本発明の特異的ポリペプチドの少なくとも1つと免疫反応を起こす抗体分子を含むことを特徴とする抗ペアチド抗体である。

例えば、huTFP_n及び組合因子結合部位のポリペプチド類似物と免疫反応する抗体分子を含む、本発明の抗体組成物は組合因子が因子W/M_nと結合する能力を中和できる。従って、好ましい抗体組成物は、huTFP_n及びp26-49又はp146-167と反応し、かつ、p204-226と実質的に免疫反応しない抗体分子を含むものである。huTFP_nに対して生ずるポリクローナル抗血清は、p204-226と免疫反応する抗体を含むことに注意すべきである。このように、抗204-226免疫反応性が実質的でないことが、本抗体組成物と従来の報告されているものとの区別する特性となっている。

本発明の抗体組成物の典型的生産は、ホ乳動物を、本発明の接種物で免疫化し、適当なポリペプチド免疫特異性を有するホ乳頭抗体分子を誘導することによって行なわれる。さらに、その抗体分子をそのホ乳動物から収集し、例えば、免疫アフィニティ・クロマトグラフィーのような従来技術によって、その必要量を算出する。このように生産した抗体組成物は、なかんずく、体液及び身体サンプルにおけるhuTFP_nを検出するための、本発明のシステムで用いることができる。

として、効果的な免疫原量の本発明のポリペプチドを含む。他の事項の中で、単位投与量当たりの効果的なポリペプチド量は、当分野ではよく知られているように、接種される動物種、その動物の体重及び選択した接種レジメンに依存する。典型的に、接種物は、接種（投与）量約1.0マイログラムから約500ミリグラム、好ましくは、約50マイログラムから約50ミリグラムのポリペプチドを含んでいる。

本発明の接種物に用いられている“単位投与”という語句は、各ユニットが、必要とする希釈剤、すなわち、キャリヤー又はヒクルと共に望ましい免疫原的效果を産むのに必要な量を決められた量の活性物質を含む、動物に対する1回の投与に選した物理的に分離した単位を意味する。本発明の接種物の新しい単位投与に関する明細は、何活性物質の独特な特性及びその独自の免疫学的效果、及びここで詳細に公開されている動物中の免疫学的使用に内在する制限により説明され、かつ直接保存しており、これらが本発明の特徴となっている。

典型的には、接種物は、水、食塩水又はリン酸緩衝食塩水などの生理学的に許容された（受容できる）希釈剤中にポリペプチド結合物を分散させることにより、乾燥した固体のポリペプチド結合物から水性組成物を調製することができる。

また、接種物は希釈剤の一部として、アジュバントを含んでいる。完全フロイントアジュバント（CFA）、不完全フロイントアジュバント（IFA）及びミキウバンのようなアジュバントは、当分野ではよく知られており、いくつかの会社から市販されている。

1. 抗体及び抗体組成物

種々の文法型の“抗体”という語は、イムノグロブリン分子及

モノクローナル抗体組成物も、本発明で考案されている。後出限界内で、モノクローナル抗体組成物は、効果的にhuTFP_nを結合しうる、唯一一種類の抗体結合部位を含んでいる。従って、典型的に、本発明のモノクローナル抗体組成物は、それがhuTFP_n以外のタンパク質を結合できる抗体をたとえ食んでいたとしても、huTFP_nへの結合親和性を示す。ひとつの場合において、モノクローナル抗体組成物は、huTFP_n及び、組合因子結合部位のポリペプチド類似物、好ましくはp26-49又はp146-167と免疫反応する抗体分子を含んでいる。

他の場合において、本発明は、huTFP_nと免疫反応し、huTFP_nにより開始する凝集を阻害する抗体分子を含む抗凝集（中和）MoAbを考案した。さらに凝集を阻害する好ましいMoAbは本発明のポリペプチド、好ましくは、huTFP_n結合部位ポリペプチド類似物、及びさらには好ましくは、第1表で示されているポリペプチドと免疫反応することを特徴とする。

他の場合において、抗凝集MoAbは、huTFP_n及びhuTFP_n因子W/M_nの複合体と免疫反応し、huTFP_nによって開始する凝集を阻害（中和）する抗体分子を含んでいる。さらに、好ましい抗凝集MoAbはhuTFP_nポリペプチド p1-30又はp26-49と免疫反応することを特徴とし、またこれは、huTFP_nポリペプチド p56-71と免疫反応しないことが好ましい。

また、本発明は、組合因子の凝集を開始する能力を中和しない抗体分子を含む非中和性モノクローナル抗体組成物も考案した。そのような組成物は、huTFP_n及びポリペプチド p1-30と免疫反応し、かつ、ハイブリドーマTF9-10H10により生産（分泌）される抗体分子を含むことが望ましい。

本発明のモノクローナル抗体組成物は、適当なポリペプチド

平成 7.12.20 発行

異性をもつ抗体分子を分離するハイブリドーマを含有する栄養培地を含む、モノクローナルハイブリドーマの培養を開始することによって生産することができる。

このハイブリドーマが培地中に、その抗体分子を分離するのに十分な条件及び時間、培養を維持する。それから、抗体有培地を収集する。さらにこの抗体分子を従来法により粗離する。

これらの組成物の調製に有用な培地は、当分野ではよく知られておりました、市販されていて、合成培養培地、同血球凝集マウス及びそれに類するものが含まれている。代表的合成培地は、4.5 g/mのグルコース、2.0 mMグルタミン及び2.0%ウシ胎児血清を補足した、グルベコ最小培地(DMEM:グルベコ(Dulbecco)等、ヴィロロジー(Virology)、8巻、396頁(1959年))である。代表的同血球凝集マウス株はBalb/cである。上述の方法で生産したモノクローナル抗体組成物は、例えば、huTFh含有免疫反応の形成が必要である、は断及び治療法で用いることができる。

1. ハイブリドーマ

本発明のハイブリドーマは、huTFhと免疫反応する抗体分子を生産することを特徴とする。さらに、好ましいハイブリドーマは、huTFhで開始する凝集を阻害し、また、好ましくは、本発明のポリペプチド、好ましくは、huTFh結合部位ポリペプチド類似物、そしてさらに好ましくは、第1表に示されているポリペプチドと免疫反応する抗体分子を生産することを特徴としている。さらに好ましい態様においては、抗凝集MoAbは、非ヒト、空長短、T1と免疫反応する。

他の好ましい態様において、本発明のハイブリドーマはhuTFh及びhuTFh:因子VIIaの複合体と免疫反応し、huTFh

VIIa複合体形成速度の減少によると考えられている。従って、生体内において、huTFh因子VIIa結合部位ポリペプチド類似物の投与は、凝集やある炎症反応のような、組織因子の因子VIIaへの結合により開始する生理学的応答を調節するのに用いることができる。好ましい態様において、このポリペプチドは、先に述べたように、リン脂質中に分散して投与される。

生体内における組織因子による因子VIIa/VIIaの結合を調節する他の方法は、本発明の抗体組成物(抗ペプチド抗体)又は抗凝集MoAbの効果量を静脈注射により投与することである。この抗体分子は、パラトビック領域を含み、かつイムノグロブリン分断片F(ab')₂、F(ab)及びそれに類するもののような、Fc領域を含まないものである。治療的に効果的量の抗凝集MoAbは、体重1g当たり1.5μgから5μg、好ましくは体重1g当たり約1.00μgから約1.0μg、より好ましくは、体重1g当たり約1.50μgから約5.00μgの範囲である。

他の態様において、本発明のMoAb、抗凝集MoAb又は非中和性MoAbの抗体分子を抗凝集試薬に結合し、抗凝集治療組成物が作られる。このようにして作った、効果量の抗凝集治療組成物を、その表面に組織因子を発現する凝集細胞を有する被検者に投与することができる。このような凝集細胞の代表例は、狗及び豚のがん細胞である。

ここで考案された凝集試薬の代表例には¹³¹I、¹¹³Rb、¹¹³Bi及びこれに類するもののような放射性核種がある。放射性核種結合モノクローナル抗体治療組成物の製造法及びその使用法は、コザック(Cozak)等(トレンド・イン・バイオテクノロジー(Trends in Biotech.)4巻、259~264頁(1986年))により報告されている。

により開始する凝集を中和する抗体分子を生産する。さらに、huTFh:因子VIIaの複合体と免疫反応するハイブリドーマは、huTFh結合部位ポリペプチドP1-30又はP26-49、好ましくはその両方と免疫反応し、かつ、より好ましくは、該抗体分子が、ポリhuTFhポリペプチドP56-71とは免疫反応を起こさないことを特徴としている。

望ましい免疫特異性を有する、すなわち、特別なタンパク質をして、またはポリペプチドと免疫反応する抗体分子を生産する(分離する)ハイブリドーマの作成法は、当分野ではよく知られている。特に、ニマン(Nimna)等により報告されたハイブリドーマ技術は(プロセーディング・イン・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci.) U.S.A. 80巻、4949~4953頁(1983年))、有用である。好ましいハイブリドーマを、例13の第5表に示した。

ハイブリドーマ培養物TF8-5G9、TF9-6B4及びTF9-10H10はブタベスト協定に従がい、1987年3月27日ATCCに保育され、各々登録番号:HB9382、HB9381及びHB9383が割当てられた。

II. 治療方法及び組成物

本発明のhuTFh因子VIIaの結合部位ポリペプチド類似物、抗体組成物、モノクローナル抗体組成物及び抗凝集MoAbは各々、生体内において、組織因子による因子VIIa/VIIaの結合を調節するのに用いることができる。

例えば、huTFh因子VIIa/VIIaの結合部位ポリペプチド類似物は、幼果盤を被検者に投与したとき、因子VIIa/VIIaの組織因子への結合を競争的に阻害することができる、医療的に許容しうる組成物に用いることができる。この阻害は、組織因子-因子VIIa/VIIa

投与されたポリペプチド又は抗体分子含有組成物は、溶液又はサスペンションの形をしているが、ポリペプチドは、錠剤、丸薬、カプセル、放出持続型剤又は粉末の形もとる。どの場合にも、この組成物は、0.10%~9.5%、好ましくは、2.5%~7.0%の活性成分を含んでいる。

活性成分としてポリペプチド又は抗体分子を含む治療組成物の調製は、この分野ではよく知られている。典型的には、このような組成物は、液体溶液又はサスペンションのような注射可能な形に調製されるが、注射前の液体溶液又はサスペンションを作るために適している固体形としても調製される。またこの調製物はエマルジョン化されることもある。この活性抗原成分は、しばしば、医療的に許容でき、かつ、活性成分に適合する賦形剤と混合する。例えば、典型的賦形剤としては、水、食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノール又はそれらに類するもの及びこれらの組合せたものがある。加えて、もし、望ましいなら、この組成物は、加湿剤又はエマルジョン化剤、pH調節剤のような、活性成分の効果を促進する補助物質を少量含ませることも可能である。

ポリペプチド又は抗体分子組成物は、中和した医療的に受容しうる塩の形に調整することもできる。医療的に受容しうる塩には、酸性加塩(ポリペプチド又は抗体分子の遊離しているアミノ基で形成される)及び、例えば、酢酸又はリン酸のような無機酸又は、酢酸、シウ酸、酒石酸、マンデル酸のような有機酸及びこれらに類するもので形成されるものがある。遊離したカルボキシル基で形成する塩も、例えば、ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム又は鉄の水酸化物のような無機塩及びイソプロピルアミン、トリスチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカイン及びこれらに類するもののような有機塩が

平成 7.12.20 発行

とサンプルの相対量、試薬／サンプル混合物の維持時間、温度、バッファ条件及びそれに頼するもののような、少なくとも1回の検定法のパラメーターを明確に記述してある。

好ましい態様において、さらに、本発明の診断システムは、試薬を含む複合体の形成を知らせるラベル又は指示手段を含んでいる。

ここで用いられているように、図々の文法型の“ラベル”及び“指示手段”は、複合体の存在を示す後出可能な信号を産み出すのに直接又は間接的に関連する单一の原子及び分子を意味する。“生体内”ラベル又は指示手段とは、被検者の体内で有用なものである；どのラベル又は指示手段も、本発明の抗体又はモノクローナル抗体組成物の一部である抗体分子、発現したタンパク質、又はポリペプチドに結合又は組込まれていることもあるし、また別々に使用されることもあり、また、これらの原子又は分子は付加的試薬と組合せて、又は単独で使用されうる。このようなラベルは、臨床的診断化学においては、よく知られているものであり、それらが、他の新しいタンパク質、方法、そして、又はシステムとともに使用されるときに限り、本発明の一部を構成する。

ラベルの結合、すなわち、ポリペプチド及びタンパク質のラベル化は、当分野ではよく知られている。例えば、ハイブリドーマによって生成される抗体分子は、培養培地中の成分として与えられたとき、放射性同位元素含有アミノ酸の代謝的取り込みによるラベル化が可能である。例えば、ガルフレ (Gelfre) 等の、メソング・イン・エンザイモロジー (Beth. Enzymol.) 73巻、3~46頁 (1981年) 参照。活性化官能基を介するタンパク質の結合又はカップリング技術は特に有用である。例えば、オーラメアス (Auramess) 等の、スカンジナビアン・ジャーナル・オブ・

第22章及び米国特許第3,654,090号、第3,850,752号及び第4,016,043号に報告されている。

このように、好ましい態様において、本発明の発現したタンパク質、ポリペプチド又は抗体は固相マトリックスに固定され、この診断システム中に、分包されている固体サポートを形成している。

典型的に、この試薬の固体マトリックスの固定は、他の固定法もあるが、この分野でよく知られている水性媒液からの吸着が用いられている。

有用な固体マトリックスは、当分野でよく知られている。このような物質には、ファルマシア・ファイン・ケミカルズ社 (N州、ビスカタウェイ) から、セファデックスという登録商標で市販されている、架橋デキストラン；アガロース；Iシガ、北シガ、アボット・ラボラトリーズ社から市販されている直径約1ミクロン~約5ミリメートルのポリスチレンビーズ；シート状、ヒモ状又はヘラ状のポリ塩化ビニルポリスチレン、架橋ポリアクリルアミド、ニトロセルロース又はナイロンベースの織物、又は、ポリスチレン又はポリ塩化ビニルでできているチューブ、プレート又はマイクロプレートのウェルが含まれる。

ここで述べられている診断システムの試薬、ラベル化結合試薬又は、増巾試薬は、液体分散物として溶液として、又は、例えば、凍結乾燥型のような、実質的に乾燥粉として提供される。指示手段が薄葉である場合、この薄葉基質も、システムの別の包むに提供される。先に述べた、マイクロプレートのような固体サポート及び1つ以上のバッファも、この診断検定システム中に別にパッケージされた要素として含まれている。

診断システムに関連して、ここで指摘されているパッケージは、

ら説明される。

治療用のポリペプチド又は抗体分子含有組成物は例えば、単位投与量の注射によるように、局所的に又は静脈注射により簡便に投与される。

本発明の治療組成物に対して用いられる“単位投与”という語句は、ヒトに1回投与するのに適した、必要とされる用量剤、すなわち、キャリヤー又はビヒクルと共に、望ましい治療効果をあげるために計算された、予め決められた量の活性物質を含む、物理的に分離されている単位を意味する；

該組成物は、投与物形状に適した方法で、治療的に効果的な量が投与される。投与される量は選択される投与、活性成分を利用する投与の血液凝集システムの容量及び望ましい組成因子結合能の障害又は中和度に依存する。投与される必要のある活性成分の精密な量は、医師の判断に依存し、かつ、各個人によっても異なる。しかし、通常のポリペプチド投与範囲は、1日に、患者当たり、1から5ミリグラムの活性物質というオーダーであり、投与の経緯に依存する。第1回投与及び二次免疫の適正な治療計画もいろいろであるが、典型的には、一次投与後、1時間以上の間隔を置いて、さらに注射又は他の方法による投与が繰り返される。別に、血液中、10ナノモル濃度から10マイクロモル濃度を維持するのに十分な、持続的静脈注入法も考慮されている。

L. 診断システム

本発明のキット型の診断システムは、少なくとも1回の検定に十分な量の、分包試薬として、本発明の発現タンパク質ポリペプチド、抗体組成物又はモノクローナル抗体組成物を含んでいる。また、この分包試薬の使用説明書も含まれているのが普通である。

典型的に、“使用説明書”には、試薬濃度には、混合する試薬

イエノロジー (Scand. J. Immunol.) 8巻、補版7巻、7~23頁 (1978年)、ロッドウェル (Rodwell) 等の、バイオテクノロジー (Biotech.) 、3巻、889~894頁 (1984年) 及び米国特許第4,493,795号参照。

また、診断システムは、好ましくは分包の、特異的試薬を含む。“特異的結合試薬”は、本発明の試薬を選択的に結合できる分子であるが、本発明のタンパク質発現産物、ポリペプチド又は抗体分子そのものではない。代表的な特異的結合試薬は、抗体分子、抗体タンパク質又はその断片、タンパク質A、血清凝集因子IgM、子ウシ組成因子及びそれに類するものがある。この特異的結合試薬は、反応物が複合体の一部として存在するとき、これと結合することが望ましい。

好ましい態様において、特異的結合試薬はラベル化される。しかし、その診断システムが、ラベル化されていない特異的結合試薬を含むとき、典型的には、この試薬は、増巾手段又は試薬として用いられる。これらの態様において、このラベル化した特異的結合試薬は、この増巾手段が、反応組合有する複合体に結合しているとき、この増巾手段に特異的に結合することができる。

本発明の診断キットは、血清、血漿又は尿のような体液サンプル中のIgM T F H の存在又は量を検出するのに“ライザ”方式で用いることができる。“ライザ法”は、サンプル中に存在する抗原又は抗体量を検出及び定量するための、固相に結合した抗体又は抗原及び酵素-抗原又は酵素-抗体結合物を用いた、酵素結合免疫吸着検定法のことである。ライザ法の説明は、全て参考としてここに記載されている、1982年、CA州コサンゼルスのラング・メディカル・パブリケーションから出版された、D. P. サイツ (Sites) 等の基本的及び臨床的免疫学、第4版、

平成 7.12.20 発行

は既システムにおいて通常使われるものである。このようなパッケージには、ガラス及びプラスチック製の（例えば、ポリエチレン、ポリプロピレン及びポリカーボネート）ボトル、バイアル、プラスチック及びプラスチックホイルでラミネートした外袋及びこれらに頼するものが含まれている。

5. 検定法

本発明は、本発明の抗体又はモノクローナル抗体組成物中に含まれている、発現されたタンパク質、ポリペプチド又は抗体分子を含む複合体を生産することによりトロトFトを検出する方法を考案した。当業者には、これらの複合体を形成するのに利用できる多くの、よく知られている臨床的診断の化学手段があることが理解できよう。従って、典型的な検定方法がここで説明されているが、これは、本発明を制限するものではない。

6. 血栓検出

被検者中に存在する血栓検出法が考案された。生体内での指示手段と結合する抗体を含む本発明の、効果的量のモノクローナル抗体組成物を、被検者に静脈注射する。好ましい態様において、ラベル化した抗体は、トロトFト及び第1表及び第2表のポリペプチドと免疫反応するが p 204 ~ 226 とは反応しないもので、好ましくはハイブリドーマ T P 8 - S G 9 、 T P 9 - 6 B 4 又は T P 9 - 10 H 1 0 から生産されたものである。

それから被検者を、ラベル化した抗体分子が、血栓の一部に存在するトロトFトと反応し、複合体を作るのに十分な決められた時間、及び、好ましくは、未反応の抗体分子が体内から一掃されるのに十分な付加的時間維持する。その後、被検者を、生成した複合体の存否及び好ましくはその位置について検定する。

7. 身体サンプル中のトロトFトの検出

一トした。

その後、残留細胞固体を各々、その固体をヘブタン：ブタノール（2 : 1）2.5ミリリットル（ml）当り、組織固体1gの割で、ヘブタン：ブタノール（2 : 1）と混合することによって行う5回の抽出を行ない、ついで遠心により、その固体を回収する。最後の遠心後、残留細胞固体を再び大気圧下、約20℃で一晩で乾燥し、脱脂細胞粉末を作り、必要になるまで、-80℃で保存する。

つづいて、該細胞粉末2.5グラムをT S / E D T A バッファ（1.00ミリモル濃度（mM）NaCl、5.0 mMトリス・塩酸（pH 7.5）、0.02%アジ化ナトリウム、5 mMエチレンジアミン四酢酸（EDTA）、0.1%（V/V）トリトンX-100（ポリアリルエチレン-9-オクチルフェニルエーテル））500 mlと混合し、ついで4℃で一夜攪拌する。さらにこの混合物を15,300×gで1時間遠心する。生じたベレットを500 mlのバッファA（1.00 mM NaCl、5.0 mMトリス・塩酸（pH 7.5）、0.02%アジ化ナトリウム、2%トリトンX-100）に再溶解し、スラリーを作る。室温で1時間の搅拌後、このスラリーを上述のように遠心する。生じた上清を回収し、凍結乾燥した後、100 mlのバッファAに溶かして、トロトFト含有抽出溶液を作る。

8. トロトFの凝血活性を測定するための凝集検定法

トロトFプロコアグラント活性を、37℃で維持した、全試薬及び混合物を用いて行う、1段階凝集検定法で測定した。血漿と同容積の、2.0 mMクエン酸ナトリウム水和物及び14.0 mM NaCl（pH 7.4）を含む浴液を混合することにより、正常なヒト血漿をクエン酸化した。T S / B S A 液（15.0 mM NaCl、

身体サンプル、好ましくは体液サンプル中のトロトFトの存在、及び好ましくはその量を検出するため、競合的又は非競合的な、種々の不均一及び均一検定法が利用できる。例えば、液体体液サンプルと、ラベル化した p 26 - 49 を、マイクロプレートのウェルの内壁に固定した、ハイブリドーマ T P 8 - S G 9 又は T P 9 - 10 H 1 0 から生産された抗体分子を含む固体サポートと混合し、固相免疫反応混合物を作る。この混合物をサンプル中に存在するトロトFト及びラベル化した p 26 - 49 が、固体サポートとして存在する抗体分子への結合を競争し、固相免疫反応混合物を形成するのに十分な時間、生物学的検定条件下に維持する。未結合のラベル化 p 26 - 49 を、免疫反応産物から取り除く。その後、免疫反応産物として結合したラベル化 p 26 - 49 の量を測定し、その差により、トロトFトの存在を検定できる。

例

次に示す例は、本発明の説明を意図したもので、これを制限するものではない。

1. 組織因子含有ヒト抽出物の調製

生後で得られた正常なヒトの脛を12時間以内に処理するかましくは、-80℃で保存する。その腫瘍及び大脛を除き、ついで残存する筋部分を、ポリトロンホモジナイザー（N Y 、ウェストバリー、プリンクマン、インスツラメント社）を用いて、等容量の冷（0℃）アセトン中でホモジネートした。このホモジネートしたものをさらに3倍容の冷アセトンと混合し、その組織固体部分を、洗浄ガラスロートを用いて遠心して回収した。各々7回の2倍容の冷アセトンとの混合及び引きつづく遠心により、残留固体からアセトン可溶性物質を抽出した。最後の遠心の後、残存するアセトンを、20℃、一晩、残留固体から大気圧下でエバボレ

5.0 mMトリス・EC 6 (pH 7.5)、0.1%子ウシ血清アルブミン）で希釈したトロトFを含むサンプル1.00マイクロリットルを、1.00 mlのクエン酸化血漿と混合した。2.5 mM CaCl₂ 溶液1.00 mlを混合し、凝集反応混合物を作り、凝集が始まるまでゆっくりと振らした。CaCl₂ 添加と、凝集形成の間の時間を測定した。それから、トロトF活性の標準曲線を、秒で示した凝集時間と希釈率をプロットすることにより作った、代表的標準曲線を第3図に示した。

3. トロトFの親和性基團のための、因子V含有固体サポートの調製

ヒトの因子V/VIIを参考文献として組込まれている、フェア（Fair）の報告（プラッド（Blood）、62巻、784~91頁（1983年））に従って準備した。この準備した因子V/VIIを、アガロース固体マトリックスに結合するため、4℃で一晩、その5ミリグラム（mg）を、0.1 M 2-（N-モルホリノ）エクシスルホン酸（MES）（pH 6.5）に対して透析した。塩化カルシウムを最終濃度1.0 Mとなるように添加した。それから因子V/VIIを4 mlのアフガル-15活性化アガロースビーズ（CA 8、リッチモンド、バイオラド・ラボラトリーズ社）と混合し、生じた結合反応混合物を、製造業者が推奨するもの（バイオラド）に従って4℃、4時間の回転処理を行った。

固体サポート上の過剝タンパク質結合部位を、その固体サポートを、0.1 M グリシンエチルエステル中、室温で1時間搅拌することにより、ブロックした。その後、この固体サポートを、洗浄ガラスロート上各約2.0 mlのIIバッファA、II 1 M NaCl含有バッファA、II 5 mM E D T A 含有バッファA及びII 1 M CaCl₂ 含有バッファAをこの順序で用いて洗浄した。それか

平成 7.12.20 発行

ら透析の液体を減圧下で除き、半乾燥状の粒子物質（ケーキ）を作った。

h u T F の因子Ⅷ／Ⅸと親和性による単離

0.1Mのグリシンエチルエステル及び0.1M MES (pH 6.5) を含む2.0mlの溶液を、22.5mlのアフィゲル-1.5アガロースビーズ（バイオラド）と混合し、結合反応混合物を作る。この結合反応混合物を室温に1時間維持する。この生成した結合物を、洗浄ガラスロート上、10倍容のバッファ1を用い、減圧下で通過することにより洗浄し、グリシンエチルエステル-アガロースケーキを作った。

例1で調製した3.0mlの脂抽出液を、1.0M 塩化カルシウムを含む5リットルのバッファAに対し、4℃、1喫透析を行う。透析した脂抽出物を、グリシンエチルエステル-アガロースケーキと混合し、固液相反応混合物を作る。回転しながら室温で2時間維持した後、この固液相を洗浄ガラスロートを用いて通過することで分離する。この液相を回収し、最終濃度は当り1.0ユニットとなるようにトライロール（MO州、セントルイス、シグマケミカル社、アプロチニン）と混合する。この回収した液相を例3で調製した因子Ⅷ／Ⅸ／アガロースケーキと混合し、第2の固／液相混合物を作る。

この混合物を回転しながら、一喫もとに維持し、h u T F - 因子Ⅷ／Ⅸ含有固相産物を形成させ。その後、この固相及び液相を先に述べたように通過により分離する。洗浄ガラスロート上に残留する固相を1.0M 塩化カルシウムを含むバッファA 25mlで洗浄した。さらに、この固相を洗浄ガラスクロマトグラフィーカラム（0.5×15cm、バイオラド）に移し、6mlの同洗浄バッファで洗浄した。上記の洗浄後、この固体サポートに結合

h u T F を、10分の1容のTF 8-5G9又はPAb100（ATCC-TIB115；ここでネガティブコントロールとして用いられているSV40ラージT抗原特異的抗体を生産するハイブリドーマ）ハイブリドーマ培養上清とともに、4℃で1喫インキュベートすることにより免疫沈殿化を行った。アガロースビーズ（MO州、セントルイス、シグマ・ケミカル社）上に固定したヤギの抗マウスIgGを、その第1次免疫反応産物を吸収するのに用いた。このビーズを同バッファでよく洗浄し、結合したh u T F を、DTT存在下又は非存在下、同バッファ中で5分間煮沸することにより溶出した。SDS-PAGE後、タンパク質バンドはオートフルオログラフィーで可視化した。

单離したh u T F を放射性ヨウ素化し、DTTで還元し、ついで10%アクリルアミドゲルでSDS-PAGE分析したとき、47kDaの見かけの分子量をもつ單一のメインバンドが観察された（第4図）。しかし、未還元のh u T F を同様に分析した場合は、およそ58及び47kDaの2つのバンドが相対的に等しい量で観察され（第5図レーンB）、このことは、少なくとも2つの異なる多基のもののが存在を示している。

非還元で観察されるこの2つのバンドに対する説明としては、その大きな方、すなわち、泳動が遅いバンドは、非常に多くのグリコシル化を受けたものか、付加的なプロセッシングを受けていないタンパク質を有しているのか、又は、付加的な、ジスルフィド結合で結合したポリペプチドと会合しているのかもしれないというものである。還元後の單一バンドの存在は、はじめの2つの示唆と一致している。その後者の可能性は中でも一番大きいようと思われるが、その小さいサイズの差のために、付加的ポリペプチド鎖は、色素の場所又はその付近に泳動するような十分小さいも

したh u T F を、洗浄ガラスカラム上に保持されている固体サポートを5nMのEDTAを含むバッファAで洗浄することにより、溶解（溶出）させる。溶出した物質を1mlで2回洗出し、各回分について、例2で述べた方法により、h u T F の存否を検定した。h u T F 含有回分を集め、4℃で、1%トリトンX-100を含む5リットルのTBS（150nM NaCl、150nMトリス塩酸、pH 7.5）に対して1喫透析した。

このようにして作った透析物をつづいて、4倍容の冷アセトンと混合し、h u T F タンパク質を沈殿した。この沈殿をおよそ1.0g、5000×g、30分間の遠心で濾過した。生成したペレットを窒素露囲気下で乾燥した。典型的な収量は、脱脂した脂抽出粉末1グラム（乾燥重量）当り、-2mgのh u T F であった。

このようにして生じた单離h u T F サンプルをTBS/トリトン中に懸滴し、ついで、製造業者の指示に従い（1L、ロックフォード、ピアス・ケミカル社）、ヨードゲンを用い、NaIO₄でラベル化した（1L州、アーリントンハイツ、アマーシャム社、マイクログラム当り1.5マイクロキューリ）。ラベル化後、透析の未反応^{131I}IをTBS/トリトンを用いたセファデックスG25（NJ、ピスカタウイ、ファルマシア社）での脱脂クロマトグラフィーにより、ラベル化したh u T F から分離した。

^{131I}Iラベル化h u T F 含有サンプルのラウリル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による（SDS-PAGE）評価は、レムリ（Laemmli）（ネイチャー（Nature）、227巻、680～685頁（1970年））の方法に従った。還元条件下で評価するサンプルに対しては、100nMのジオヌスレイトールを、サンプルバッファ中に含有させた。1%トリトンX-100、50nMトリス塩酸（pH 7.4）、150nM NaCl中の^{131I}I

のらしく、還元後、10%アクリルアミドでは分離されないので、であろう。1.5%のポリアクリルアミドゲルの還元及び非還元h u T F の電気泳動は、單一の分離した経緯を示すには失敗したが、いくつかの少量の、遅く泳動するバンドが観察された（第5図、レーンA及びB）。これらのおかげで、少量のポリペプチドは、以前に報告されているように（ブローズ（Broze））等、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー（J. Biol. Chem.）、260巻：10917～20頁（1985年）及びグローブ（Grove）等、ブロードディング・イン・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス（Proc. Natl. Acad. Sci.）USA、83巻、299～302頁（1986年））、汚染物を示している。この可能性を明らかにするため、47kDa及び58kDaのバンドは非還元ゲルから切り出され、その各々を、ジオヌスレイトールで還元し、その各々を、1.5%アクリルアミドゲルを用いたSDS-PAGEにかけた（第6図、レーンC及びD）。58kDaタンパク質は12.5kDa軽鎖及び47kDa重鎖であると分った。47kDaのタンパク質を分析したとき、同分子量の重鎖のみが観察された。このように、両者は、SDS-PAGEで同様の挙動をもつ重鎖を保有していた。

直接軽鎖の存在を示すため、^{131I}-h u T F を、h u T F 特異的モノクローナル抗体TF 8-5G9で免疫沈殿化し、それを還元剤存在下の電気泳動にかけた。主要な47kDaバンドがおよそ、12.5kDaの分離したバンドとともに観察された（第6図、レーンA）。還元化しないサンプルの電気泳動でおよそ47kDa及び58kDaのバンドを生じたが、低い分子量のポリペプチドは生じなかった（第6図、レーンB）。また非還元h u T F の電気泳動は、ブローズ（Broze）等（ジャーナル・オブ・バイオ

平成 7.12.20 発行

ロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.)、260巻:10917
～20頁(1985年)により示唆されているhuTF重鎖のダイ
マーと一致する、少量の90kDaタンパク質も示した。

huTF重鎖が直接からタンパク質の分解によって生ずるとい
う可能性を研究するため、SDS-PAGEにより早急した経鎖
及び重鎖を、N末端アミノ酸配列分析にかけた。

重鎖及び軽鎖をSDS-PAGEで分離し、アバーソールド
(Abersold)等の高pH法(ジャーナル・オブ・バイオロジカル・
ケミストリー(J. Biol. Chem.)、261巻:4225～4238
頁(1986年))を用い、活性化した、アミノ酸濃度ファイバーガ
ラスフィルター上に電気プロットした。このタンパク質バンドを、蛍光染料(アバーソールド(Abersold)等、上記)により、こ
のプロットを可視化し、切り出し、そして、まだファイバーガラ
スに結合したまま、PTH誘導体のオシ・ライインHPLC分析を
用いたアブライド・バイオシステムズ470Aタンパク質シーケンサーで配列決定した。別にタンパク質バンドをコマージ・ブ
ルーによる染色によりゲルを可視化し、シーケンシングのために
に、電気溶出した。両方法とも似しい結果を与えた。

huTF重鎖のマイクロシーケンシングは、ほぼ等モル量の
アミノ酸配列で一致した結果となった。ほとんど全ての場合、各
アミノ酸残基は2サイクル離れて、2度出現する。これは、長さ
がN末端で2残基異なるhuTF重鎖の2つのバリエントがねじ
れたN末端をもつことの明白な証拠である。大きい方のバリエント
のN末端は、非特異的アミノ酸Xを含む

Ser-Gly-X-X-Asn-Thr-Val-Ala-Ala-Tyr-X-Lys-Thr-Trp-Lys-ser
であることが説明された。

軽鎖の配列決定するいくつかの試みは、ブロッカされたN末端

タンパク質染色によって、結合した小ポリペプチド鎖を検出する
ことは困難である。

イン・ヒトでは、早急にhuTFが凝集を開始するにもかか
わらず、huTFによる凝集の生理的開始は、細胞表面で起こる。
軽鎖は、直接的凝集検定法で検出することができる。huTF機能
又は結構において重要な役割をはたしていることが推察できる
であろう。例えば、軽鎖は、因子VII/VIIIaの組合因子への結合の
正の協同性を説明すると仮定されてきている。因子VIIに対する2
つのサブユニットレセプターのアッセンブリーに関与している可
能性がある。別に、細胞表面上の構造ドメインでのhuTFの構
造及び、細胞表面上でのhuTF活性の制御は、huTF軽鎖に
仲介されるのかもしれない。

N結合オリゴ糖の役割は、111I-huTFサンプルの脱グル
コシル化により試験した。毎分およそ 3.6×10^3 カウントを含
む、ラベル化ヒトTF約1.274ナノグラムを0.4ユニットのグ
リコペプチダーゼII(ENzyme、インディアナボリス、ベーリング
社、マンハイム・バイオケミカルス社)、20mMトリス塩酸
(pH 7.5)、1.0mM EDTA、及び1%トリトンX-100
を含む20μlの溶液と混合し、37℃で16時間維持した。それから、この脱グリコシル化した産物を、先に述べたSDS-
PAGEで分析した。

第7図、レーン4及び5に示した、脱グリコシル化の研究結果
は、58kDaのhuTFは、別のタンパク質部分、すなわち軽
鎖の存在のため、47kDaのものよりも、高い相対分子量を示
すことを表わしている。

このようにして早急したhuTFを、再脂質化し、そのプロコ
アグランツ活性が再構成された。最高の活性を有する再脂質化粗

と一致して、なんら配列の情報を与えなかった。しかし、huTF
の重鎖及び軽鎖は、単離されたヒトTFに対して生じた、2つの
ウサギの抗huTF抗体及び28個の、マウスモノクローナル
抗体の全てが、重鎖のみに結合することが分っていることから、
抗原的に全く別のものである。それゆえ、軽鎖は、重鎖のタンパ
ク質分解断片とは考えにくい。さらに軽鎖は、ペーター・ミクロ
グロブリンに対する抗体とは反応しなかった。

現在、125kDaのhuTF軽鎖の意味は知られていない。それ
ば、單一の、独立した分子種なので、ランダムなジスルフィド
交換による、単離の際にアーティファクトとして誤認されたもの
でもないようだ。還元なしに、既知性による早急を行なったhuTF
をSDS-PAGEにかけたとき、huTF活性は、58kDaと
47kDaの分子量に対応するゲルから溶出した。これら2つの
分子量に対応するhuTF活性も、粗月又は部分的に単離した脂
質の抽出物を、SDSゲルの電気泳動にかけたとき(データ示さ
ず)も検出された。全ての場合において、その活性は、因子VII存
在で、このことは、huTFのみが因子VIIを活性化でき、かつ、軽鎖はこの
機能に必要なことを示している。

軽鎖がhuTF重鎖のおよそ半分のみにジスルフィド結合して
いることは興味深い。生体内で、huTFの重要な領域に不在な
のか、存在するのかとは別に、界面活性剤で分解される、非共有的
相互作用を介して結合しているのであろう。軽鎖は、サイズが
小さく、SDS-PAGEの際にマーカー色素の部分に泳動して
しまうため、また、huTFの報告されている分析例が還元後行
なわれていることから、初期の研究では気づかれなかった。現行の
既知性を用いた方法で早急することができる測定された量では、

成因子産物を提供するに必要な粗月因子: 脂質比が、0.1% B
SAを含むHBSバッファ溶液(20mMヘキス、pH 6.0、
140mM NaCl、0.01%アジ化ナトリウム)中、種々の濃
度となるように、上述の得られた単離huTFを溶かすことによ
り実験的に測定された。それから、種々huTF粗月物を以下に
述べるように再脂質化し、さらに、例2で報告されている凝集檢
定法で測定された、最も高い活性を示す比が、後の使用のために
倍増された。

huTFの再脂質化のための脂質は、M0州、セントルイス、
シグマケミカル社から入手できるウサギの脂アセトン抽出粉末か
ら抽出することにより調製した。この粉末を、粉末1gに対し、
2.5mlのヘブタン:ブタノール(2:1、v/v)の割でヘブ
タン:ブタノールと混合し、ついでこれに含まれる固体を焼結ガ
ラスロートを用いた過濾により回収した。残留固体について、こ
の抽出を6回くり返した。さらに、この残留固体をロト・エバボ
レーションで乾燥し、クロロホルムに溶解後、-80°Cで保存し
た。必要なときに、そのクロロホルムに溶解した固体を窒素雰囲
気下で乾燥し、新しく調製した0.25%のデオキシコール酸ナト
リウム溶液中、4mg/mlとなるように溶解し、ウサギグリシン脂
質溶液(PBPL)を作った。

再脂質化には、各huTF粗月物100μgを、100μlの
PBPL溶液、0.76μlの1%ウシ血清アルブミンを含むH
BS溶液(HBS/B SA)及び40μlの100mM塩化カル
ミウムと混合する。この混合物を2時間、37°Cで維持し、つい
で、ここに含まれるhuTF活性を、例2で述べた凝集檢定法で
測定した。

5. ハイブリドーマ及びモノクローナル抗体の作成

平成 7.12.20 発行

全てのハイブリドーマは、6～8週間の年令の、スクリップス・クリニック・アンド・リサーチ・インスチチュート、動物飼育場から入手できるマウスのBalb/cマウス由来の脾細胞を用いて作成された。

a. マウスTF8の免疫化

例4で説明した親和性单離化hutTF5マイクログラムを100 μg/mlとなるよう生理食塩水に溶かし、MO州ハミルトンのリビ・イムノケム・リサーチ社から入手したR-700アジュバントと1:1の割合で混ぜ、エマルジョン化した。ついで、このエマルジョンをマウスTF8に皮下注射した。

このマウスTF8は同様に、約2週間後、変性hutTF及びR-700アジュバントを含むエマルジョンの接種を受けた。変性hutTFは、0.09%トリトロンX-100、0.93%SDS、0.2M-2-メルカプトエタノール及び270 μg/ml hutTHを含むTBS(150 mM CaCl₂、50 mMトリス-HCl、pH 7.5)を、5分間煮沸して調製した。その後、この変性したhutTFを、等容量の、0.6mg/mlマウス血清アルブミンを含む生理食塩水と混合した。つづいて、4倍量のアセトンを、この変性hutTF溶液に溶け、生じた混合物を、一晩、-20℃で保った。生じた沈殿を約13000×g、10分間の遠心で集め、4:1(v/v)のアセトン:水で一度洗浄してから、0.1mg/mlとなるよう、200 μgの生理食塩水で懸濁した。

最初の注射から、約4週間後、0.1mg生理食塩水中3μgの親和性单離化hutTFを、0.1mlの完全フロイント・アジュバント(cFA)と混合し、エマルジョンを作り、これをマウスTF8に腹腔内注射をした。

最初の接種から8週間後、リン酸緩衝食塩水中15 μgの親和

ム・バイオケミカルズ)をイムロン、96穴フレキシブル・ピニルマイクロプレートのウェルに入れた。それからこのプレートを、1時間、37℃を維持し、IgGをウェルの壁に吸着させた。

TBSで3回洗浄した後、3%オバルミンを含む100 μlのTBS/トリトンを各ウェルに入れ、過剤のケンパク質結合部位をブロックした。

ウェルを、1時間、約20℃で維持したのち、そのブロッキング液を、アスピレーターで除いた。そして、各ウェルに50 μlのハイブリドーマ培養上清を加えた。できた固相相免疫反応混合物を1時間、37℃で維持した。その後ウェルをTBSで3回洗浄し、過剤の液は、アスピレーターで除いた。

例4で説明した、TBS/トリトン中、およそ1mgのhutTFと、およそ5×10³ cpmを含む、50 μlの111ラベル化hutTFを各ウェルに入れ、第2の固相相免疫反応混合物を作った。そのウェルをTBS/トリトンで3回洗浄し、固相に結合した111ラベルTF含有免疫反応産物を単離した。過剤の液体はアスピレーターで除き、ウェルを乾燥させた。個々のウェルを切り離し、各ウェルに含まれる111を、ガムカウンタで計数した。

バックグラウンド放射活性(hutTFと抗体の反応無しの場合)はウェル当たり、平均約200～300 cpmであったが、一方、hutTFと抗体の反応が有る場合は、ウェル当たり10000 cpmのカウントがある。抗hutTF抗体の生産が正と検定されたハイブリドーマを選択し、本発明のハイブリドーマとした。つづいて、これらのハイブリドーマを、以下に述べるドット・プロット検定でスクリーニングした。

b. ドット・プロット・ライザ法

例4で説明した、アセトン沈殿したhutTFを、4:1(v/v)

性单離化hutTFを静脈注射(1. v.)し、同じhutTF/PBS接種を24時間後にも行った。そのマウスTF8の脾細胞を融合のため3日後に採取した。

c. マウスTF9の免疫化

マウスTF9は、2回のリビ・アジュバント注射に、エマルジョン化前に変性したhutTFを用いること以外は、マウスTF8と同じ接種スケジュールがほどこされた。さらに、第1回目のPBS接種の腹腔内注射をcFA含有接種後4ヶ月半後に行なった。

d. ハイブリドーマの作成

TF8及びTF9由来の脾細胞に、同じ融合操作を行った。各マウス由来の脾細胞約1×10⁶個を、3.0%ポリエチレンゴール(PEG4000、ATCC25322-6B-3)を含む200 μlの融合媒体中、2×10⁶のP3X63Ag8.653.1エローマ細胞と混合した。細胞融合後、生じたハイブリドーマを96穴プレートに接種し、HAT培地(ヒガキサンチン、アミノブテリン、及びチミジン)中で培養し、つづいて、hutTFと反応する抗体分子生産能でスクリーニングした。

両マウスTF8及びTF9脾細胞由来の融合体共、HAT融合媒体耐性ハイブリドーマ細胞クローンを生じた。TF8融合体は907個のHAT耐性ハイブリドーマを、一方TF9融合体は、348個のHAT耐性ハイブリドーマを生じた。

e. 抗hutTF抗体分子の生産によるハイブリドーマのスクリーニング

a. 固相RIA

TBS中、20 μlノンミリ接種した100 μlのヤギ抗マウスIgG(IN州、インデアナボリス、ベーリングラー・マンハイ

のアセトン:水溶液で抽出した。残存する沈殿をTBS中に20 μg/mlとなるよう懸濁した。このhutTF溶液20 μl(1 μg)を、消えないインクで、BA83ニトロセルロース紙(シュレイチャー・アンド・シェエル、NH州、キー)上に書いた数字の間にスポットする。スポットしたhutTFを空気乾燥し、個々のスポットをパンチを用いて、ディスクに切り出す。個々のディスクを、BLOTTO(ジョンソン(Johnson)等、ジェネティック・ナリティカル・テクニック(Gene, Biol., Tech.)1巻、3頁(1984年))を含む、多穴トレイの個々のウェルに挿し、約1時間、37℃で維持した。

このBLOTTOを、ウェルからアスピレーターで除き、各ウェルに、200 μlのハイブリドーマ培養上清を加えた。さらにこのウェルを2時間、37℃で保ち、その後、このペーパーディスクを、TBSで2回洗浄し、ウェルから取り出し、TBSにより、さらに洗浄するため、1つの大きな容器に入れた。ついで、過剰の液体をその容器から除去する。

プロトプロット試薬キットの(MI州、アン・アーバー、プロメガバイオテク社)アルカリホスファターゼ結合抗マウスIgGを、BLOTTOで5700倍に希釈し、このペーパーディスクと接触させた。このプロトプロット溶液との接触を、37℃で30分間保った。その後、ペーパーディスクを、TBS中で3回洗浄した。筆者の指示に従い、プロトプロットキット中に含まれている発色物質により、ディスク上に結合したアルカリホスファターゼが検出される。

f. ウエスタン・プロット検定法

ウエスタン・プロット検定のため、例4で報告したように单離した約10 μgのhutTFをサンプルバッファ(2% SDS、

平成 7.12.20 発行

5.0 mMジチオスレイトール、10%グリセリン)に溶かし、5分間、煮沸した。それから、これを、レムリ(Leemli)により報告された(ネイチャー(Nature)、226巻、680頁(1970年))、参考としてここに組込まれている、予め染色された分子量標準の小さい両側のレーンの間の広いレーンに試料をロードする、分取型のスラブゲルを用いたSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけた(分子量標準: MA州、ニュートンセンター、ディバーシファイド・バイオテク社)。並びとしてここに組込まれている、トウビン(Towbin)等(アロシーディング・イン・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci.) USA, 76巻、4350頁(1979))により報告されているように、電気泳動及びニトロセルロースへの電気プロッティング後、このプロットを、TBS中の5%脱脂粉乳溶液でプロックし、マニカルFに固定した(MA州、ケンブリッジ、イエヌテクス社、ミニブロック)。8個のハイブリドーマ細胞培養上清のストックを、各マニホールドスロットにロードし、37°Cで1時間インキュベートした後、このプロットを取り除き、TBSで洗浄した(0.02%アジ化ナトリウム含有TBS)。抗体が結合したレーンを、発色物質で発色させたアルカリホスファターゼを結合した第2抗体を用い、供給業者の推める方法に従って可視化した(WI州、マジソン、プロメガバオテク、プロトプロット)。陽性のストック由来の培養上清を、5%脱脂粉乳TBSによる8倍希釈物について、別個に再テストし、抗TF抗体を生産する個々のハイブリドーマを同定を行った。

抗トロTF抗体生が正と判断されたハイブリドーマをさらに特異づけるために選択した。例えば、上記のTF8融合体由來のハイブリドーマは、例6bで述べられているドット・プロット検

5G9モノクローナル抗体1.0mgの透析により、活性化した。活性化したTF8-5G9を、2mlのアフィゲル-10アガロースビーズ(バイオラド)と混合し、できたカップリング反応混合物を、製造業者の指示に従がい処理して、TF8-5G9/アガロース固体サポートを作った。

それから、例3で報告したように、固体サポート上の過剰のタンパク質結合部位をプロックし、洗浄後、液圧過して、TF8-5G9/アガロースケーキを作った。

9. huTFの免疫親和性による単離

ヒトの脳のおよそ半分、すなわち約100gに等しい、例1で調製した脳抽出液を、計6mlのバッファAに対し、2回の外板交換をしつつ、4°Cで3日間透析した。その透析した抽出物を1.5時間、10,000×gで遠心した。できた上清を、例4で調製したグリシンエチルエステル-アガロースケーキと混合し、固液相反応混合物を作る。回転しながら、2時間室温に保持したのち、その固相と液相を焼結ガラスロートによる遠心で分離した。そのhuTF含有液相を回収し、例8で調製したTF8-5G9/アガロースケーキと混合し、固/液相反応混合物を作った。

この免疫反応混合物を、回転しながら一晩、4°Cに保ち、粗抗体分子含有固相免疫反応物を形成させた。それから、この固相及び液相を先に述べたように遠心で分離した。固相が残留し、これを10倍容のバッファAで洗浄した。その後、固相をガラスクロマトグラフィーカラムに移し、順次、0.1%トリトンX-100を含む2倍容の1M NaCl、及び0.1%トリトンX-100を含む2倍容の0.1Mグリシン(pH4.0)で洗った。

上述の洗浄後、その固体サポートに免疫学的に結合しているhuTF、その固体サポートを、焼結ガラスロート上に保持した

定法及び例6cで述べられているウェスタンプロット検定法でhuTFとの免疫反応を、そのハイブリドーマ培養上清が示すならば、抗huTF抗体産生ハイブリドーマ培養と特異づけられる。これらの特徴は、24個のTF8ハイブリドーマ細胞系列についてみられ、そのほとんどは、例13の第5度に示した。その他のスクリーニング法で選択したハイブリドーマにより産生される抗体分子は固形細胞を独自の融合体に提供する免疫化マウス(すなわちTF8又はTF9)、及び、独特のHAT培養耐性ハイブリドーマ細胞が単離される。96穴培養プレート、列番号及びウェル番号を示す文字によって呼ばれる(すなわち、5B7、11D12、その他)。特殊な意味の文字は、1語、ハイフン語又は2語として、ここにリストされる。例えば次の文字は同じモノクローナル抗体分子組成を意味している: TF8-5G9、TF8-5G9及びTF8-5G9。

7. イムノグロブリン IgG の単離

イムノグロブリン IgG は、製造業者の指示に従がい、バイオラドラボラトリーズMAPS IIシステムを用い、マウスのハイブリドーマ細胞系列TF8-5G9(ATCC株HB9382号)を含むマウスの腹水液から単離される。単離したIgGのタンパク質濃度は、製造業者の説明書に従がい、BCAタンパク質検定試薬(ピアスケミカル社)を用いて測定した。

8. huTFの免疫親和性による単離のための、抗huTF含有固体サポートの調製

抗huTF抗体を、アガロース固体マトリックスへカップリングするため、少なくとも1回透析液交換を行う。0.1M MES、pH 6.5を含む50.0mlの透析バッファに対する、4°C、16時間の、例7で報告したように調製したMAPS単離TF8-

また、0.1Mグリシン、pH 2.5及び1%トリトンX-100溶液20mlで洗浄することにより、開放(溶出)した。それから、例4に全て述べたように、溶出物質を回収し、huTF検定を行ない、算めて透析した。

透析物を4倍容の冷アセトンと混合し、huTFタンパク質を沈殿化した。さらにこの沈殿をおよそ-10°C、5,000×g、30分の遠心で沈めた。生成したペレットを窒素雰囲気下で乾燥し、そのペレットの一部を変性条件でのSDS-PAGEで分析した(SDS-PAGE)。

第8図に示したこの分析結果は、huTFが免疫親和性により、脱脂粉末1g当り、33%のhuTFの收率で単離されることを示している。

10. 抗huTF抗体による凝集の阻害

10μMのハイブリドーマ培養上清を、例4で調製した約2mlの再脂質化huTFを含む90μlのHBS/BSAと混合した。このようにして作った免疫反応混合物を30分間37°Cに保ち、抗huTF抗体分子を免疫学的にhuTFに結合させ、免疫反応産物を形成させた。つづいて、この免疫反応混合物について、例2で述べたように、huTFのプロコアグラン特活性を検定した。ネガティブ・コントロールとして、無関係のIgG調製物を抗huTF抗体の代りに用いた。

効果的huTF濃度は、インヒビターの存在下測定した凝血時間を行い、例2のように作った凝血曲線から外挿した。阻害は、用いた実際のhuTF濃度について、効果的huTF濃度の比率として表わされる。少なくとも50%の阻害をするモノクローナル抗体分子調製物は、本発明の抗体分子成分を中和するものとして選択された。

平成 7.12.20 発行

例6に述べたように、早発したhuTFに対して生じたハイブリドーマ由来の致多い培養上清を、凝集開始を阻害する能力について、先の操作により測定した。有意に凝集を阻害することが分ったハイブリドーマを、第5表に示した。

また、抗huTF抗体による凝集阻害は、予め形成されたhuTF-因子VII複合体を用いて行った。例4で調製した再脂質化したhuTF 1mgを含む10μlを、HBS/BSA 10μl、2.0 mM塩化カルシウム10μl及び、例3で述べられているように調製した因子約2.5ngを含む10μlと混合する。この混合物を1.5分間37℃で保温し、huTFを、混合物として残る因子VIIと複合体をつくる。その後、10μlの溶液に、例7で述べたように調整したMAPS-单酰化モノクローナル抗体約1.0ngを混合し、この第2の混合物を、3.0分間37℃で保温した。さらに、第1に2.0 mM塩化カルシウム100μlについて、ヒトのクエン酸化血漿又は例12で述べてのように調製した因子VII欠損血漿を加え、ついで砂で洗浄された凝血時間を見測ることにより、生成した混合物の凝集阻害の測定を行った。例10で述べられているように、阻害率を表わし、予め形成したhuTF-因子VII複合体での阻害の結果を、第6表に示した。

第6表

抗huTFによるhuTF-因子VII依存の凝集阻害

1. クエン酸化ヒト血漿による凝集

抗体	因子VII	阻害率
プランク*	+	0
TP85G9*	+	58%
コントロール*	+	0
TP85G9	-	83%

複合体により開始する凝集を阻害する能力を有すにもつと考えた。これらのM・Abには、TF9-1B8、TF9-5B7、TF8-5C4、TF8-11D12、及びTF8-21F2がある。

1.1. ポリペプチド合成

ここで使用されている種々のhuTF-h領域に対応するポリペプチドモハゲンメイヤー(Hagensein)等(ボップーセイラーズ(Hoppe-Seyler's)Z、フィジオロジカル・ケミストリー、353巻、1973頁(1982年))のシンメトリカル・アンハイドライド法を用いたアラブイド・ハイオシスティムズモデル430Aペプチド合成器で化学合成した。第1及び第2表のポリペプチドに加え、以下に示す第3表のポリペプチドも合成し、これには、huTF-hと反応できる抗ポリペプチド抗体の生産に有用な、本発明のポリペプチドが含まれている。

第3表

抗原性ポリペプチド

p221-155	H-TKVVTVTVEDETLVRRNNTLSSLRQVTCKDLYITL-OH
p204-226	H-DSPECHGQIKGEFREIFYXIGA-OH
p225-244	H-GAVVTVVIIILVIIIAISLHK-OH
p245-263	H-CRKAGVQGSWENSPLNVS-OH

1.2. ポリペプチドによる凝集阻害

huTF依存の凝集開始を抑制する、本発明のポリペプチドの能力を、まず、このポリペプチドを因子VII/VIIa及びカルシウムイオン存在下でインキュベーションし、さらにこの混合物を、因子VII/VIIa欠損血漿に加えて、凝血時間を見測った。

ヒトの因子VII/VIIaを例3に述べた方法で早発した、HBS/BSA 10μl当り、この早発した因子VII/VII 200 ngの溶液10μlに、100μl HBS、20μl 2.5 mM CaCl₂及び100

コントロール

2. 因子VIIアブリート化ヒト血漿

抗体	因子VII	阻害率
プランク	+	0
TP85G9	+	58%
コントロール	+	0

a. "プランク"とは、モノクローナル抗体を検定法で用いなかったことを示している。

b. "TP85G9"とは、ハイブリドーマTF8-5G9から単離したモノクローナル抗体を検定で用いたことを示している。

c. "コントロール"とは、検定で無関係なモノクローナル抗体を用いたことを示している。

d. "+"は、抗体を混合物に加える前、因子VIIを加え、標識したhuTFと複合体を形成させることを示す。

抗huTF抗体による凝集阻害の別の研究が、TFを因子VII/VIIaと会合させ、TF:因子VII/VIIa複合体を形成させる前後の阻害を比較する条件下で行った。

これらの研究で、予め形成したTF:VII/VIIa複合体を用いた抗huTF抗体による凝集阻害を、利用するモノクローナル抗体含有溶液1.0μlにMAPS-单酰化モノクローナル抗体含有溶液の代りに、ハイブリドーマ培養上清を用いた以外、例10で述べたと基本的に同様に行つた。比較のため、抗huTF抗体による凝集阻害を、例10で述べたように、因子VII/VIIaを含むクエン酸化ヒト血漿との混合の前、それら抗体及び再脂質化huTFの免疫複合体を形成することにより検定した。

ここで述べている全ての抗体は、この比較阻害検定試験を行つたが、約60%以上の阻害を示すものだけが、huTF:VII/VIIa

μlの合成ポリペプチド含有TBS/トリトンを加えた。種々の濃度で含まれる多種の混合物をこのように調製し、それを、1.5分間、37℃に維持した。例4で述べたように調製した再脂質化した組織因子を、HBS/BSAで希釈し、例2で述べたような凝集後定法でテストしたとき、10μlでおよそ4.5秒の凝集時間が得られるように調製した。上記のように維持した混合物をさらに、再脂質化huTF 1.0μlを添加し、2.5 mM CaCl₂ 1.00μl及び1容の血漿に対し1.5容のHBSで希釈した因子VII/VIIa欠損血漿1.00μl(KA州、オーバーランド・パーク、ジョージ・キング・バイオメティカル社)と混合した。凝血時間の延長は、この合成ポリペプチドによる凝集の阻害を示していることになる。阻害率を、例10で述べているように計算した。少なくとも30%の凝集阻害を示すポリペプチドはhuTF-h結合部位ポリペプチド類似物、すなわち、第4表のセクション1で示されているポリペプチド、p26-4.9、p146-107及びp161-189である。

別に、上記阻害検定において、モノクローナル抗体による免疫親和性吸着により、因子VII/VIIa欠損血漿である因子VII/VIIa欠損血漿を用いた。ヒトの因子VII/VIIaに対するモノクローナル抗体を、例3で述べたように単離した因子VII/VIIaをhuTFの代りに免疫原として用いた以外、例5で述べたものと基本的に同様に調製した。できたハイブリドーマを、イライザ法で絶滅し、IN州、サウスベンド、エンザイム・リサーチ・ラボラトリーズ社から入手できるヒトのタンパク質、タンパク質S、因子IX、因子X及び因子IIと反応しないハイブリドーマを同定した。そのようなハイブリドーマ、FV1!、F1、2H3-3.2は、T.S.エジントン(Edington)博士から戴いた(CA州、ラゴニア、

平成 7.12.20 発行

スクリップス・クリニック・アンド・リサーチ・ファンデーション社)。イムノグロブリン IgG を、ハイブリドーマ TFV11、F1、2H3-3.2 を含むマウスの腹水から単離し、この単離した IgG を、例 8 に述べたように、固体サポートに結合させた。できた抗因子 VIII/VIIa モノクローナル抗体含有固体サポートを貯留した正常なクエンチ活性化血漿から、血漿含有液相を吸着し、保留すること以外、例 9 で述べた免疫親和性操作を用いて、因子 VIII/VIIa を強くくのに用いた。

脂質化型で用いたとき、競合的に凝集を阻害する、いくつかのポリペプチドの能力を、 $1.0 \mu\text{M}$ の合成ポリペプチド溶液の代りに、 $1.0 \mu\text{M}$ の脂質化合成ポリペプチドを用いることにより上記検定法での評価を行った。

脂質化合成ペプチドは、合成ポリペプチドを、単離したトロト F の代りに用いること以外は、単離したトロト F の再脂質化で用いた、例 4 で述べた方法で調製した。ルーチンには脂質とガリペプチドの比は 52 : 1 (w/w) が用いられた。少なくとも 30% の凝集阻害を起こす脂質化ポリペプチドが、脂質化型で存在するとき、トロト F 結合部位ポリペプチド類似物すなわち、第 4 段のセクション II で示されたポリペプチドと考えた。

第 4 表

$\text{h}\alpha\text{T}\beta\text{f}$ のポリペプチド類似物の $\text{h}\alpha\text{T}\beta\text{f}$ による凝集開始の阻害

ペプチド	濃度	阻害
トロト F のポリペプチド類似物		
p 1 - 30	25.0	10 μM
p 26 - 49	88.8	10 μM
p 41 - 71	25.0	10 μM

た。

$5.0 \mu\text{M}$ のハイブリドーマ培養上清を各ウェルに入れ、1時間 37°C に維持した。さらにこのウェルを TBS で 3 回洗浄し、過剰の液体をアスピレーターで除いた。

单離化 $\text{h}\alpha\text{T}\beta\text{f}$ は、例 9 で述べたように、免疫親和性カラムで調製した。单離化 $\text{h}\alpha\text{T}\beta\text{f}$ を含むアセトン沈殿を TBS / ノトリトンに溶かし、そのタンパク質濃度を、調造業者の説明書に従がい、BCA タンパク質検定試薬 (ピアス) を用いて測定した。 $\text{h}\alpha\text{T}\beta\text{f}$ の炭化水素側鎖を、オシャネシー (O'shannessay) 等の報告した方法 (イムノロジカル・レターズ (Immunol. Letters), 8巻、273-227 頁 (1984 年)) に従がい、ビオチンヒドラジフ (NY 州、ブレインビュー、ICN バイオメディカル社) を用いて、ビオチン化し、ビオチン化 $\text{h}\alpha\text{T}\beta\text{f}$ 液を作った。

TBS / ノトリトン中 $60 \text{ ng}/\text{ml}$ に調製した $5.0 \mu\text{M}$ のビオチン化 $\text{h}\alpha\text{T}\beta\text{f}$ 液を、 $5 \mu\text{M}$ 合成ポリペプチドとともに、各ウェルに入れ、1時間、37°C に維持した。その後、このウェルを TBS / ノトリトンで 3 回洗浄した。

5 mM EDTA、 0.5% ノトリトン X-100 及び 1% BSA を含む TBS で $1/100$ に希釈した、 $1.0 \mu\text{M}$ のストレプトアビジン-結合アルカリホスファターゼ (NY 州、ニューヨーク、エンジバイオケム社、デテクトー社) を各ウェルに入れ、30 分間、37°C に維持した。その後、このウェルを、 1.0 M リン酸カリウム (pH 6.5)、 2% BSA、 0.5% ノトリトン X-100、 0.5 M 塩化ナトリウム及び 1mM EDTA を含む浴液を 4 回洗い、ついで後出バッファ (0.1 M トリス・塩酸 (pH 8.8)、 0.1 M EGTA、 5 mM B₂Ca₂₊) で 1 度洗った。

その後、後出バッファ中、 2mM の p-ニトロフェニルリン酸

p 60 - 49	25.0	10 μM
p 56 - 71	25.0	10 μM
p 72 - 104	25.0	10 μM
p 94 - 123	20.0	10 μM
p 121 - 155	10.0	10 μM
p 146 - 167	87.5	10 μM
p 161 - 189	32.5	10 μM
p 190 - 209	20.0	10 μM
p 204 - 226	20.0	10 μM
なし	0	

B. リン脂質化ペプチド

p 1 - 30	81.0	10 μM
p 26 - 49	83.0	10 μM
p 40 - 71	65.0	10 μM
p 50 - 71	73.3	30 μM
p 94 - 123	93.7	10 μM
p 121 - 155	55.0	10 μM
p 146 - 167	80.0	10 μM
p 161 - 189	94.0	10 μM

C. 例 12 で述べたように測定した阻害率

上記のポリペプチド阻害研究で得られた代表的投与-応答曲線を第 9 及び第 10 図に示した。

D. ポリペプチドによる抗体- $\text{h}\alpha\text{T}\beta\text{f}$ 免疫反応の阻害

フレキシブルビニルでできたイムロン U 底 96 穴プレート (ダイナテク社) のウェルを過剰タンパク質結合部位のプロッキングを、37°C 20 分間行うこと以外、例 6 で述べた方法でヤギ抗マウス IgG (ベーリングガーマンハイム社) によりコーティングし

を含む培液 $1.0 \mu\text{M}$ を各ウェルに加え、1時間 37°C に維持する。ついで、 $4.05 \text{ nA}\text{m}^{-2}$ の光学密度を各ウェルについて、バイオ・テク・マイクロプレートリーダー (VTEC、クイノースキ、バイオ・テク・インスクリメント) を用いて測定した。

この競合的阻害研究の結果を第 5 表に示した。

第 5 表

モノクローナル抗体とペプチドの相互作用の表

Bad ^a	p 1	p 26	p 40	p 41	p 56	p 72	p 94	p 121	p 145	p 161	p 190
	-30	-49	-71	-49	-71	-104	-123	-155	-167	-189	-209
TF85G9	+										
TF811D12	+										
TF85C4											
TF821F2											
TF91D5											
TF92C4	+		+								
TF92F6											
TF95C7	+		+								
TF96B4											
TF99C3	+		+								
TF910C2											
TF91F1											
TF91E7											
TF91B8											
TF91B9											
TF94D11	+		+								
TF95G4	+		+								
TF95B7	+		+								
TF96G4	+		+								

平成 7.12.20 発行

TF97E10	+	+
TF98B	+	+
TF99E1	+	+
TF99S4	+	+
TF96CB	+	+
TF910H5	+	+
TF99DS	+	+
TF910H10	+	+

- a. 各モノクローナル抗体 (Nb) は、同名のハイブリドーマにより產生された。全てのハイブリドーマは例 1.3 で述べたように、ハイブリドーマ培養物上清を用いてスクリーニングした。
b. これらの抗体は、例 1.0 の結果から中和性をもたないと考えた；その他の全ての抗体は、同結果に従い中和性をもつと考えた。

もし、ポリペプチド存在下で得られた吸光度測定値が、ポリペプチド存在下で与えられた抗体に対して得られた平均吸光値から 1 以上の誤差偏差をもつとき、誤差が有意に起ったと考えた。

1.4. 2 位イライガ法による身体サンプルにおける h u T P 検出

血液、血漿、唾液、尿、その他の身体サンプル中の h u T P は、同じ h u T P 分子に同時に結合することができる 2 つのモノクローナル抗体を用いて検出できる。

イムロン・ボガスチレン U 底 9-6 穴プレートを、まず、各ウェルに、TBS 中 10 μg/ml に稀釀した IgG-1000 Nb を入れ、ついで、ウェルと、IgG 液波との接触を、4℃、一晩維持することにより、ヤギ抗マウス IgG (ベーリングマンハイム社) でコートした。そのウェルを、TBS で 3 回洗浄し、ついで、

が h u T P に同時に結合できる能力をもつ限り、いろいろ変えることができる。例えば、第 1 抗体として、TF9-6B4 を用いたとき、TF9-11D12 を、TF9-10H10 の代りに、第 2 の抗体として用いることができる。このように、本発明は、本検定法で同時に結合できる種々の抗体の組合せを考案した。

1.5. 全プレ h u T P コード配列を含む DNA 断片の構築

全プレ h u T P コード配列を含む DNA 断片を第 1.1 図にその制限地図に示されている、組換えプラスミド pCTF64、pCTP403 及び pCTP314 と、この分野でよく知られている操作を用いて構築することができる。例えば、マニアチス (Mannatis) 等、NY 州、コールドスプリングハーバー、モレキュラー・ラボラトリー、ラゴラトリーマニュアル、モレキュラー・クローニング (1983 年) 参照。

第 1.1 図で示されている組換え DNA プラスミド中に含まれる挿入断片は、クローニングを可能にする、各末端の EcoRI リンカーカー 5'-GGATTC-3' (MA 州、レキシントン、コラボラテブリサーチ社) を有している。これらのリンカー配列は、天然の h u T P h DNA コード配列の一部ではないので、第 2 図に示されるスクレオチド配列中には存在しない。組換え DNA 分子構築の説明は、同様の h u T P h DNA 配列についても明らかのように、EcoRI 末端を含む消化により生じ、これらの付加的なリンカー配列を含む断片は、第 2 図で示したスクレオチド塩基番号によって示されるだろう。この断片は、その末端にこれら附加的配列を含むことが理解できよう。

プラスミド pCTF64 を、制限エンドスクレアーゼ EcoRI 及び DnaII で消化し、第 2 図で示される、塩基残基 1~296 番に対応するスクレオチド配列を含む DNA 断片を作った。このよ

各ウェルに、3% BSA を含む TBS / トリトン 100 μl を加えた。その後、これらのウェルを 1 時間、37℃ に維持してから、TBS で 3 回洗浄し、さらに、過剰の液体をアスピレーターで除いた。

第 1 のハイブリドーマ、TF9-6B4 由来の抗体と T P 抗体分子含有培養上清 1000 Nb を各ウェルに入れ、1 時間 37℃ に維持した。それから、これらのウェルを TBS で 3 回洗浄し、ついで過剰の液体を、アスピレーターで除いた。

例 9 で調製したように、免疫吸着性を除し、アセトン沈殿化 h u T P を、TBS / トリトンで溶した。この h u T P 液波の溶液を TBS / トリトンで 5 μg/ml から 0.5 μg/ml の範囲で調製し、稀釀液 1000 Nb をイムロンプレートのウェルに入れた。この h u T P 稀釀液を、第 1 の抗体と接触させ、1 時間 37℃ に維持した。さらにこの希釈液をウェルから除き、ウェルを TBS / トリトンで 3 回洗浄した。過剰の液体をアスピレーターで除いた。

抗体と T P 抗体を、例 7 で述べた方法により、第 2 のハイブリドーマ TF9-10H10 の腹水から MAPS で単離した。この抗体溶液のタンパク質を測定し、ついで、例 1.3 で述べたようにビオチン化によりラベル化した。

このビオチン化した抗体と T P 抗体を TBS / トリトンで 60 μg/ml に希釈し、この溶液 100 μl を各ウェルに入れた。そのウェルを 1 時間、37℃ に維持し、ついで TBS / トリトンで 3 回洗った。

この結合した、ビオチン化抗体と T P 抗体を、例 1.3 で述べたデテクターアイクシステムを用いて検出した。この検定法で第 1 及び第 2 の抗体として用いているモノクローナル抗体は、その 2 つ

うにして作った、302 スクレオチド塩基対 (bp) 断片をアガロースゲルを用いたサイズ分画により単離し、アルカリホスファターゼを用いた処理により脱リン酸化した。

プラスミド pCTP403 を制限エンドスクレアーゼ EcoRI で消化し、第 2 図の残基 776~1125 番に対応するスクレオチド配列を含む DNA 断片を作った。生成した 352 bp の断片を、アガロースゲルを用いたサイズ分画により単離した。

プラスミド pCTP314 を、制限エンドスクレアーゼ EcoRI で消化し、生成した 647 bp の断片をサイズ分画で単離した。この断片は、第 2 図の残基 135~775 番の配列に対応するスクレオチド配列を含んでいる。647 bp 断片をサイズ分画で単離し、アルカリホスファターゼで脱リン酸化した。

この 352 bp 断片及び脱リン酸化した 647 bp 断片を T4 DNA リガーゼの反応によって標的的に結合 (ライゲーション) し、第 2 図の残基 135~1125 番に対応するスクレオチド配列を有する 999 bp の断片を作った。

さらに、この 999 bp 断片を、制限エンドスクレアーゼ DnaIII で消化し、第 2 図の残基 296 と 297 番の間でこの 999 bp 断片を切断し、これによって、168 bp と 831 bp の断片が生ずる。さらに脱リン酸化した 302 bp の断片と、831 bp の断片を T4 DNA リガーゼで標的的に結合し、第 2 図の 1~1125 番に対応するスクレオチド配列を含む 1125 bp 断片を作った。

EcoRI で消化して、クローニングプラスミドベクター pUC8 を液状にした。先に調製した 1133 bp 断片と、EcoRI 消化したベクターを T4 DNA リガーゼで標的的に結合して組換え DNA 分子 pUC-グレート h u T P を作った。

大田原 R1 株 (MD 州、ゲイサーズバーグ、ペセダリサ

平成 7.12.20 発行

ーチラボラトリーズ)をpUC-ブレ huTFhでトランスポームし、そしてアンビシリントン性に基づいて、トランスポーマントを選択した。それから、この選択したトランスポーマントをクローニングし、ブレ huTFh構造遺伝子をもつ組換えDNA分子の存在によりスクリーニングした。

ブレ huTFh構造遺伝子をもつ組換えDNA分子の存在によるスクリーニングは、各選択されたトランスポーマント由来のrDNAをEcoRIで消化することによって行った。生じたEcoRI断片をアガロースゲルでサイズに従って分離した。352bp、781bp及び2682bpのDNA断片に対応する三つのバンドパターンを示す組換えDNA分子でブレ huTFh構造遺伝子の存在を確めた。上述のEcoRI消化パターンを生ずるrDNAを有する大腸菌RR1トランスポーマントは、本発明の組換えDNA分子を含み、かつ、選択され(回収)された。

細胞外アンカー領域を含むが、カルボキシル末端にトランスメンブレン・アンカー領域を欠く、ブレ huTFhコード配列の実質的領域を含み、従って、可溶性huTFhタンパク質をコードするDNA断片を次のように構築した。

プラスミドpCT-P64を制限エンドスクレアーゼEcoRIで消化し、第2図の1~486番の残基に対応するスクレオチド配列を含むDNA断片を作った。このようにしてできた486bpの断片を、アガロースゲルを用いたサイズ分離で単離し、その後、アルカリホスファターゼ処理で脱リン酸化した。つぎに、このように脱リン酸化した486bpの断片を制限エンドスクレアーゼDraIIIを用いて消化し、第2図の296番と297番の間の部位で、486bp断片を切断し、296bp及び190bpの断片とした。この296bpの断片をアガロースゲルのサイズ分離で単離した。

(1983年)の方法に従がい、互いにオリゴスクレオチドが競争的に結合するのを防ぐため、オリゴスクレオチドキナーゼによりリン酸化を行なわれなかったこと以外は同様にして、

5'-ATTTTACAGATAAGAATTGGG-3', 20

3'-ATCTCTTAACTCTTAAGCCC-5'

の配列をもつ、合成オリゴスクレオチドアダプター断片を作った。このオリゴスクレオチドをアニールし、粘着EcoRI末端を含む二本鎖DNAリソマーリンカーナー断片を作り、ローザースタイン(Rothstein)の方法(メソッド・イン・エンザイモロジー(Methods in Enzymol.)、6B巻、98頁(1979年))に従って、平滑末端とした。つぎに、このリソマーリンカーナー断片を、pUC-ブレ huTFh-Tから得た775bp断片に競争的に結合し、775bp断片の各末端に1つのアニール断片を含む817bp断片を作った。その後、この817bp断片をEcoRIで消化し、817bp断片の各末端を平滑からEcoRI粘着末端へと転換し、805bp断片とした。この805bp断片をアガロースゲルを用いたサイズ分離で単離した。

クローニングプラスミドベクターpUC18をEcoRIで消化し線状化した。先に説明した805bp断片とEcoRI消化したベクターをT4DNAリガーゼを用いて競争的に結合し、環状組換えDNA分子pUC-ブレ huTFh-TRとした。

大腸菌RR1をpUC-ブレ huTFh-TRでトランスポームし、pUC-ブレ huTFh-TRを含むクローンである、アンビシリントン性トランスポーマントを選択した。

16. 組換えhuTFhコード配列の発現に反huTFhの生成

組換えDNA分子由来の組換えhuTFhの発現は原代細胞、非常規真核細胞及びより高等な(脊椎)又は性細胞を含

プラスミドpCTF314を制限エンドスクレアーゼEcoRIで消化し、第2図の135~775番の残基に対応するスクレオチド配列を含むDNA断片を作った。この641bp断片をアガロースゲルを用いたサイズ分離で単離し、ついで、アルカリホスファターゼ処理により脱リン酸化した。この脱リン酸化した641bp断片を、DraIIIで消化し、第2図の296番及び297番の間の部位で、この641bp断片を切断し、これにより、162bp及び479bpの断片とした。このうち、479bp断片をアガロースゲルを用いたサイズ分離により単離した。

上述のように調整した296bp及び479bpの断片を、T4DNAリガーゼを用いた反応により競争的に結合(ライゲーション)し、第2図の1番から775番の配列に対応するスクレオチドアダプター配列を有する775bp断片を作った。

クローニングプラスミドベクターpUC18をEcoRIによる消化で線状化する。上記のように調整した775bp断片と、EcoRI消化ベクターをT4DNAリガーゼで競争的に結合し、環状組換えDNA分子pUC-ブレ huTFh-Tを作った。

大腸菌RR1を、pUC-ブレ huTFh-Tでトランスポームし、pUC-ブレ huTFh-Tを含むクローンであるアンビシリントン性トランスポーマントを選択した。

組換えDNA分子pUC-ブレ huTFh-TをEcoRIで消化し、生成した775bp断片をサイズ分離で単離した。

カルーザース(Caruthers)等(ジャーナル・オブ・アメリカン・ケミカル・ソサイアティー(J. Am. Chem. Soc.)、103巻、3185頁(1981年))及びゲイト(Gait)等(コールド・スプリング・ハーバー・シンポジウム・クオント・バイオロジー(Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.)47巻、383

む種々の発現媒体中で行うことができる。そのような発現媒体の代表例には、各々、大腸菌S.セレビシアエ(cerevisiae)及びチャイニーズハムスター卵巣(CHO)-細胞がある。

3. 大腸菌におけるブレ huTFhの発現

大腸菌において、ブレ huTFh構造遺伝子を発現できる組換えDNA分子は、例15で作ったpUC-ブレ huTFh構造遺伝子由来のブレ huTFh遺伝子含有DNA断片を単離し、ついで、この断片を環状発現ベクターに競争的に結合することにより構築することができる。

組換えDNA分子pUC-ブレ huTFhを、そのプラスミド中に存在するEcoRI部位を部分的に切断するような条件で、EcoRIで消化する。この部分消化法は、アニオチス(Maniatis)等、NY州、コールドスプリング・ハーバー、コールドスプリング・ハーバー・ラボラトリーズ、ラボラトリーマニュアル、モレキュラー・クローニングにより詳細に報告されている。図2の残基1番から、1125番で示される配列に対応するスクレオチド配列を含む1133bp断片を、サイズ分離によりEcoRI部分分解度から単離した。

原代性発現ベクターpKK223-3(NJ州、ビスカタウェイ、ファルナシア・ファイン・ケミカルズ社)を、EcoRIによる消化で線状化した。この消化ベクター及び1133bpブレ huTFh構造遺伝子含有断片をT4DNAリガーゼを用いて競争的に結合し、環状組換えDNA分子pKK-ブレ huTFhを作った。

大腸菌RR1をpKK-ブレ huTFhでトランスポームし、pKK-ブレ huTFh含有クローンとしてアンビシリントン性トランスポーマントを選択した。

平成 7.12.20 発行

又はブレトウTFhの発現に適合する原核性宿主媒体に導入した。そのような宿主媒体の代表例は、大腸菌RR1株である。この宿主を、組換えDNA分子でトランスキームし、細胞増殖とこの組換えDNAの発現に適合する条件下で培養し、この発現したタンパク質を従来の技術を用いて収穫した。

c. CHO細胞におけるブレトウTFhの発現

脊椎動物細胞中、ブレトウTFh遺伝子を発現できる組換えDNA分子を例16aで説明した1133bp断片を用いて構築した。

カルーダース (Carothers) 等及びゲイト (Gait) 等の方法 (上記) を用い。



の配列をもつ合成オリゴヌクレオチドアグブター断片を作り、ロザーステイン (Rotherstein) 等 (メソッズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymol.) 68巻、98頁 (1979年)) の方法に従って、粘着EcoRI及びBbvI末端を含む二本鎖DNAリソーム断片をアニーリングすることにより作った。このリソームをまず954bp断片に選択的に結合して、1008bp断片とした。ついで、1008bp断片を、T4DNAリガーゼを用い、EcoRI消化したベクターpKK223-3と機能的に結合し、環状組換えDNA分子pKK-huTFhを作った。

組換えDNA分子pKK-huTFhは、pKK-ブレトウTFhと、(II)残基1~128番の残基がない、及び全新的メチオニンコドンが、残基130番の前に選択的に結合しており、その結果タンパク質発現 (翻訳) が挿入されたメチオニンコドンの場所で始まることが異なる。

組換えDNA分子pKK-ブレトウTFh及びpKK-huTFhを、その中に含まれる構造遺伝子によりコードされるhuTFh

た。それからこの選択したトランスポータントをクローニングし、モノクローナル抗体TF8-5G9を用いて、発現するブレトウTFhタンパク質の存在を各クローンについて検定して、pSV-ブレトウTFhの存在に関する選択を行った。

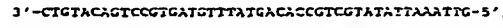
d. CHO細胞におけるブレトウTFhの発現

小鼠類細胞において、huTFhを発現することができる組換えDNA分子を、例16c由來のpSV-ブレトウTFhを、制限エンドヌクレアーゼBglIIで消化することにより構築した。生成した1153bp断片をサイズ分離で単離し、ついで、制限エンドヌクレアーゼBbvIで消化した。生じた974bp断片は、図2の残基164~1125番の配列に対応するヌクレオチドアグブター配列を含み、これを、サイズ分離により単離した。

先に述べた方法で、



及び



の配列をもつ合成オリゴヌクレオチドアグブター断片を合成し、アニールして、粘着性BglII及びBbvI末端を含む二本鎖DNAリソーム断片を作った。ついで、このリソームをT4DNAリガーゼを用いて974bp断片に選択的に結合して、第2回の残基130~1125番の残基の配列に対応するヌクレオチドアグブター配列を含む、1018bp断片を作った。

プラスミド発現ベクターpKSV-10を、BglIIで消化して線状とし、ついで、T4DNAリガーゼを用いて、1018bp断片に選択的に結合し、環状組換えDNA分子pSV-huTFhを作った。

組換えDNA分子pSV-ブレトウTFh及びpSV-huTFh

を、内在する構造遺伝子によりコードされるhuTFh又はブレトウTFhタンパク質の発現するのに適合した真核性宿主媒体中に導入した。このような媒体を含む宿主細胞の代表例には、CHO細胞がある。

宿主を、組換えDNA分子でトランスフェクトし、安定なトランスポータントを従来法で選択した。例えば、グラハム (Graham) 等、ピロロジー (Virol.) 52巻、456頁 (1973年) 及びサウザーン (Southern) 等、ジャーナル・オブ・モレキュラー・アンド・アプライド・ジェネティクス (J. Mol. Appl. Genet.) 1巻、327~341頁 (1982年) 参照。トランスポータントした宿主細胞を、細胞増殖及びその組換えDNA発現に適合した条件下で培養し、発現したタンパク質を、従来法により収穫した。

e. イーストにおけるブレトウTFhの発現

f. セレビシアエ (Saccharomyces) において、ブレトウTFh遺伝子を発現できる組換えDNA分子を、先に述べたように、



の配列をもつ合成オリゴヌクレオチド、アグブター断片を合成し、ついで例16cの1133bp断片の末端に、それを結合することにより構築した。このようにして作ったアグブター化した断片は、C141粘着末端をもつ。

イーストの発現ベクター、pTD71 (アメリカン・タイプ・ディッシュコレクション、#ATCC 31255) を、制限エンドヌクレアーゼC141での消化により線状化した。上記のC141アグブター化1133bp断片及びC141消化ベクターを、T4DNAリガーゼを用いて、選択的に結合し、環状の組換えDNA

平成 7.12.20 発行

分子 pY-ブレ huTFhを作った。

大腸菌 RR1をブレ huTFhでトランスポームし、ブレ huTFh構造遺伝子を発現するトランスポーマントを、例16 cで述べた方法により同定及び選択を行った。

f. イーストにおける huTFhの発現

S.セレビシアエ（*cerevisiae*）において、huTFh構造遺伝子を発現できる組換えDNA分子を、pY-ブレ huTFhのC1a1による消化により、第2回の残基1～1125番の配列に対応するスクレオチド配列を含む1151bp断片を作ることで構築した。サイズ分離による単離後、1151bp断片をBbvIで消化し、第2回の残基164～1125番の配列に対応するスクレオチド配列を含む978bp断片を作った。この978bp断片は、サイズ分離により単離した。

5'-CGCACATGTCAGGGCACTACAAATACTGGCCACCTATATT-3',

及び

3'-CTGTACAGTCGGTGAATGTTATGACACCGTCGGTATATAAATTG-5',

の配列をもつ合成オリヌクレオチドアダプター断片を作り、先に述べたように、アニールすることで、C1a1及びBbvI粘着末端をもつDNAアダプターを作った。まず、このアダプター断片を、978bp断片に特異的に結合することにより、1020bp断片とした。ついで、この1020bp断片を、T4DNAリガーゼを用い、例16 cで述べられているように調製したC1a1消化pTDT1ベクターと結合し、環状組換えDNA分子pY-huTFhを作った。

組換えDNA分子pY-ブレ huTFh及びpY-huTFhを、内在する構造遺伝子によりコードされるhuTFh又はブレ huTFhタンパク質の発現に適合するイースト宿主媒体中に導

17. ポリペプチド p24-35及びp159-169による凝集阻害

第7表にそのアミノ酸残基配列を示した例11で述べたように合成した。

第7表

ペプチド名	アミノ酸残基配列
p24-35	H-EHEPEPKPVNOVYT-OH
p159-169	H-IITLTYHKSSSCKETAK-OH

a. 各ポリペプチド実験名は、第1図に含まれているアミノ酸残基配列を表わしている。

それから、ポリペプチド p24-35及びp159-169について、例12で述べられているように、huTFによる凝集開始を競合的に阻害する能力を検定した。この研究の結果を第12図に示し、p24-35及びp159-169は、1.0 μM濃度で用いたとき、各々、huTFで開始した凝集を、4.5%及び2.5%阻害できることを示している。この研究において、第12図で白丸により示したこれらペプチドに対する阻害パックグランドは、第4表で示した実験結果よりも低いことに注意しなければならない。結果として、この研究において、1.0 μM濃度での凝集阻害を少なくとも20%起こすポリペプチドは、huTF結合部位ポリペプチド類似物と考えた。

従って、ポリペプチド p24-35及びp159-169は本発明のhuTFアントボリペプチド結合部位類似物を示している。また、ポリペプチド p25-49で得られた同様の結果を考慮すると、p24-35で得られた結果は、huTFh-因子II/Vh結合部位は、これら2つのポリペプチドの共通部分、すなわち、

入した。このような媒体を含む宿主細胞の代表例には、S.セレビシアエ（*cerevisiae*）細胞がある。

宿主細胞を、この組換えDNA分子でトランスポームし、選択培地で培養して、従来法により、トランスポームした細胞を単離した。例えば、ハイネン（Hansen）等プロシーディング・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス（Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75巻、1929頁（1978年）及び、ミヤジマ（Miyajima）等、セレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー（Mol. Cell. Biol.）4巻、407頁（1984年）参照。トランスポームした細胞を、細胞増殖及び組換えDNA発現に適合する条件下で培養し、ついでこの発現したタンパク質を従来法で収穫した。

g. 組換えhuTFhコード配列の発現による可溶性huTFhの生産

組換えDNA分子からの可溶性huTFhの発現は、ブレ huTFh及びhuTFhに対し、例16 cで述べたのと同様に、種々の発現媒体で行なわれた。その例において、EcoRI粘着末端を有する断片を含む1133bpのブレ huTFh構造遺伝子の例16 cでの作成と、つづいて、例16 b-fでの操作で、大腸菌、S.セレビシアエ（*cerevisiae*）及びCHO細胞の3種の発現媒体において、ブレ huTFh又はhuTFhを発現できるベクターを作った。同様に、EcoRI粘着末端を有する可溶性ブレ huTFh構造遺伝子を含み、例16 cで調製した805bpの断片を例16 b-fで述べた方法で従がって操作し、これら同発現媒体中可溶性ブレ huTFh又はhuTFhを発現できる発現ベクター（すなわち、ブレ huTFh-TR又はhuTFh-TR）を作った。

第1図で示した残基30～35、(-VNQVYT-)のアミノ酸残基配列で作られていることを示していることに注目すべきである。

18. 抗huTF抗体による凝集阻害の速度論

抗huTF抗体が、huTFの凝集開始を阻害できる時間を測定するため、この阻害の時間経過を、例10で述べた阻害検定法を用いて測定した。

例7で述べたように調製した、MAPS非活性化TF8-5G9モノクローナル抗体およそ1.0gを、1.0μg HBS/TBS中、例4で述べたように調製した非活性化huTFおよそ1.0gと混合した。このように形成した種々の混合物を、37℃で、約1から60分の間の種々の時間保持し、抗huTF抗体を、huTFと免疫学的に結合させ、免疫反応産物を作った。第13図で示した時間に、各混合物について、例2で述べたように、huTFの凝集活性を検定し、ついで、例10で述べたように阻害率を示した。

第13図で、このような速度論的測定の結果は、この検定で用いた抗体及び調製したhuTFの濃度で、6.5%以上のhuTFによる凝集開始の阻害が、10分以内に起こることを示すことが分る。より高い抗huTF抗体濃度では、より速く、完全な阻害が起こると考えられる。

19. 抗huTF抗体による、huTFによる凝集開始阻害の投与一応答

抗体投与初期にわたる、huTF凝集開始を阻害する本発明の抗huTF抗体の能力は、次の修正をした例で述べた方法により検定した。例4で調製した非活性化huTF1.0gを、0.1μgのHBS/BSA中、例7で述べたように単離した、種々の量の

平成 7.12.20 発行

TF8-5G9モノクローナル抗体と混合した。このように調製した複合物を維持して免疫反応産物を作り、つづいて例10で述べたように、h_uTFの凝血活性に対する検定を行った。

そのような投与-応答検定の結果を、第14図に示し、また、このことはこの研究で用いたh_uTF濃度に対し、あまり、およそ1~5μgの抗体はTFでの最高値の半分の阻害を示している。

同様の投与-応答実験を、h_uTF源として溶解したヒト細胞を用いて行った。

ヒトの線維芽細胞系GM1381(NIGMHSヒューマン・ジェネチック・ミュータント・セル・レポジトリ)を、2mMグルタミン、5%ウシ胎児活性及び抗生物質を補った、ダブルベコ修正イーグル培地(DMEM、NY州、グランドアイランド、ギブコラボラトリ)中、37℃で、7% (v/v) 二酸化炭素空気混合気下で培養した。GM1381細胞を増殖し、そして収穫し、さらに30×10⁶個の細胞のペレットを遠心で調製し、-70℃で凍結した。この凍結ペレットをHNバッファ(25mMヘペス、140mM NaCl、pH 7.0)中の15mMベータ、オクチルグルコビラニシド溶液9μLを加えて急速に溶解し、さらに10分間37℃で維持して、細胞を溶解した後、HN18μLを加えて、細胞溶解物を作った。

例17で述べたように単離したモノクローナル抗体TF8-5G9を、第15図に示した種々の投与に対し、0.01%BSA(ジグマ、R1A級)で稀釈した。それから各抗体希釈物2.5μLに、先に調製した細胞溶解物22.5μLを加え、60分間37℃で保って、抗体を細胞溶解中に存在するh_uTFと免疫反応させ、免疫反応産物を形成させた。その後、25mM CaCl₂

ーション混合物100μLを、50μLのヒト因子V欠損血漿及び50μLの50mM CaCl₂に添加することにより測定した。37℃、1分後、相同種の血漿の10倍希釈物50μLを因子V源として加え、凝血形成時間を2度測定した。

24個のM_oAbのうちの18個がバブーン筋TF又は、アフリカ・ミドリザル腎尿細胞抽出物のプロコアグラン特活性を阻害した(第8表)。しかし、M_oAbのいずれも、ラット、ウサギ、子ウシ、イス、牛又はブタのTFと、交差反応を示さなかった。すなわち、相同的因子V源の存在下、ヒト因子V欠損血漿のリカルシフィケーション時間促進能を示すTF調製物ではなかった。抗体のいずれも、正常なヒト血漿での検定による、ウサギTFのコアグラン特活性を示さなかった。

50μLを、免疫反応産物を含む溶液50μLと混合し、ついで、50μLのクエン酸化ヒト血漿と混合し、凝集を開始させた。このようにして作った混合物を37℃に維持し、血清の添加と、凝血形成の間の時間を測定した。効果的h_uTF濃度及び阻害率を例10に述べたように計算した。

h_uTF源として、ヒトGM1381細胞溶解物を用いた投与-応答阻害検定からの結果を、第15図に示した。これらの結果は、TF8-5G9抗体h_uTF抗体が、あまり、およそ8~10μgの抗体濃度でh_uTFのこの細胞溶解液の半分の阻害を起こしたこと示している。

20. 非ヒト組織因子とM_oAbとの交差反応性

組織因子を、羅組織(ラット、ラビット、子ウシ、イス、牛、ブタ及びヒト)又は、組織培養細胞(アフリカ・ミドリザル腎臓(COS)細胞)から単離した。組織又は細胞を歛解し、液を絞ぎ、ミンチし、組織1g当り、1mLの冷アセトン中でキモジエートし、ついで、被圧下、ワットマン#1ペーパーで通過した。この固体をアセトンに懸濁し、もう5回通過し、一晩空気乾燥したのち、-30℃で保存した。開始濃度量の1/6~1/8倍を含むアセトン粉末を細かくしてから、5mMol/L EDTAを含むTBS中、5% (v/v)となるよう懸濁し、室温で1時間混合した。10,000×g、20℃、30分間の遠心で固体を集め。ついで、TF含有液を100,000×g、1時間の上槽の遠心で集めた。このペレットを、TBS中に懸濁し、-80℃に保存した。

動物TF(TF活性をもつ粗組織抽出物)による抗体阻害を、次のように測定した。等容量のTF(1mg/mL)及びハイブリドーマ上清(TBS/BSAでの10倍希釈物)を、37℃で2時間インキュベートした。残存するTF活性を、そのインキュベ

第8表

Ab	タイプ	RIA (cpm)		FDP ラット		ラット HR		阻害率%	H _u TF の阻害
		正	負	正	負	正	負		
TF8-5G4	IgG1, F	6242	+	±	+	96	57	--	
TF8-5G9	IgG1, F	28587	+	-	+	99	80	--	
TF8-11D12	IgG1, F	29453	+	-	+	99	82	--	
TF9-1P1	IgG1, F	25193	+	+	+	95	83	H.3	
TF9-1D5	IgG1, F	3872	+	+	+	95	76	H.3	
TF9-1B7	IgG1, F	28586	+	+	+	97	90	H.3	
TF9-1B8	IgG1, F	28552	+	+	+	98	83	H.3	
TF9-1B9	IgG1, F	28528	+	+	+	97	84	H.3	
TF9-2C4	IgG1, F	24435	+	+	+	97	78	H.3	
TF9-2F5	IgG1, F	27422	+	+	+	97	79	H.3	
TF9-4B11	IgG1, F	25994	+	+	+	97	81	H.3	
TF9-5G4	IgG1, F	24073	+	+	+	97	83	H.3	
TF9-5B7	IgG1, F	25819	+	+	+	97	74	H.3	
TF9-5C7	IgG1, F	24543	+	+	+	96	72	H.3	
TF9-6B4	IgG1, F	17894	+	+	+	96	98	H.3	
TF9-6C4	IgG1, F	24065	+	+	+	95	78	H.3	
TF9-6C9	IgG1, F	8054	+	+	+	95	47	--	
TF9-7E10	IgG1, F	8025	+	+	+	97	54	--	
TF9-8E3	IgG1, F	29152	+	+	+	97	76	H.3	
TF9-9E1	IgG1, F	18169	+	+	+	90	71	H.3	
TF9-9C3	IgG1, F	30222	+	+	+	97	82	H.3	
TF9-9B4	IgG1, F	33728	+	+	+	95	82	H.3	
TF9-10C2	IgG1, F	28692	+	+	+	98	71	H.3	
TF9-10H10	IgG1, F	23585	-	-	-	0	20	--	
Pab100	IgG1, F	1929	-	-	-	0	0	--	

平成 7.12.20 発行

第 9 表

モノクローナル抗体 TFB-5G9による、

種々の細胞及び組織の凝血活性の阻害

TF 活性源	TF 活性 (% 阻害)		
	抗体なし	Pab100	TFB-5G9
精製ヒト端TF	1569	1520 (3%)	245 (84%)
粗胎盤抽出物	2059	2059 (0%)	411 (80%)
粗胎盤抽出物	1287	1344 (0%)	159 (88%)
CH1381継続芽細胞(溶解化)	990	966 (2%)	143 (86%)
ヒト単球(溶解化)	2893	2745 (5%)	176 (94%)
J82 肺腺がん細胞(溶解化)	882	902 (0%)	93 (89%)
ウサギのトロンボプラスチン	2106	2108 (0%)	2157 (0%)

1. 精製したヒト端TFを、テスト前にリビロトビヒクルに再構成した。

2. 右の 2 つの欄は、指示されている精製 IgG で処理した後測定した、ミリユニットで表わした残留 TF 活性の 2 回の平均値が示されている。残存する TF 活性の測定前、サンプルを 37 ℃ で 20 分間、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の IgG とインキュベートした。カッコ内の値は、抗体なしの同サンプル活性ユニットに対する阻害率が示されている。

21. 因子 VIII結合の研究

因子 VIIIa の TF への結合は、機能性 TF : VIII / VIIIa 複合体によるものとされるので、因子 VIIIa の TF に対する結合を妨げることによる、第 8 表に示した M. Ab の TF 活性中和能がテストされた。

ヒトの組織因子仲介による、因子 VIIIa の J82 の肺腺がん細胞表面への結合はよく調べられている。フェア (Fair) 等、ジャー

た。

この研究の結果は、上の第 8 表に示されている。TF 活性を阻害する全ての 23 個の M. Ab は、因子 VIII / VIIIa 結合も阻害した。予想されるように、TF 活性を阻害しない M. Ab 、TF9-10H10 は、因子 VIIIa の結合を阻害しなかった。

22. J82 細胞による因子 Xa 形成の阻害

J82 細胞上での h u T F : VIII / VIIIa 複合体による因子 Xa 形成速度を、次の修正をした、フェア (Fair) 等 (ジャー・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.) 262巻、11692頁 (1987年)) により報告された、多穴培養プレート法を用い 2 度測定した。細胞を、12 穴プレート中で培養し、J82 細胞への因子 VIII / VIIIa 結合の際に上述したように、検定開始前、種々の濃度の精製した、M. Ab の IgG 西分と 37 ℃ で 2 時間インキュベートした。单一の濃度の因子 VIII / VIIIa (1 mM) を検定で採用した。因子 X を最終濃度 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるよう添加した後、5、10、15 分の間隔で、50 μl の上清を採取し、550 μg の 50 mM トリス・HCl、2.25 mM Na_2CO_3 、50 mM EDTA (pH 8.2) の緩衝液中に入れた。発色性因子 Xa 濃度添加後 (TXN、ピューモント、ヘレナラバ社: 3.4 mM S-2222 50 μl)、吸光度の増加を測定することにより、因子 Xa の活性を定量した。因子 VIII / VIIIa が存在下でインキュベートした J82 細胞上清の S-2222 加水分解によるバックグラウンドを各測定値から差引いた。抗体処理の阻害率は抗体とのプレインキュベーションなしの細胞に対して計算した。

M. Ab TFB-5G9-2C4 及び TFB-5B7 による J82 細胞

- 特にことわらないかぎり、全ての結果は、ハイブリドーマ細胞培養上清の 10 倍希釈物を用いて得られたものである。毎分当りのカウント数 (cpm) で表わされているラジオイムノアッセイの結果は、ラクトバーオキシダーゼを使ってラベルした $^{125}\text{I}-\text{TF}$ を用いている。
 - 還元 (R) 又は非還元 (NR) の TF を用いて行ったウェスタンプロット。
 - 精製したヒトの端TFによって誘導されるヒト血漿の凝結の阻害。
 - J82 細胞に対する特異的 $^{125}\text{I}-\text{因子 VIIIa/VIIIa}$ 結合の阻害。
 - 粗ヒビ端抽出物 (B) 又は溶解 COS 細胞 (M) により誘導されるヒト血漿凝集阻害。M. Ab が 60% 以上の凝血活性を阻害するとき、文字がその種の場所に入れられている。
- 種々のヒト細胞及び組織により発現される凝血活性の阻害を M. Ab TFB-5G9 を用いて詳細に試験した。TFB-5G9 は、 $1 \mu\text{g}$ 濃度 $\geq 1 \mu\text{g}/\text{ml}$ のときの 90% 以上、精製再加質化したヒト TF の機能を中和する (第 18 図)。ヒトの細胞溶解物及び粗組織抽出物の凝血活性を阻害する、この M. Ab の能力も示されている (第 9 表)。 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ の IgG 濃度での TFB-5G9 は、粗端及び脂質のアセトン粉末及び溶解したヒトの継続芽細胞、肺腺がん細胞及び内毒素活性化末梢細胞の凝血活性の 80% 以上を定量的に阻害する。

ナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.) 262巻、11692 (1987年)。従って、細胞表面 h u T F : VIII / VIIIa 複合体会合に関する M. Ab の効果は、J82 細胞を、抗体とブレインキュベートし、さらに、 $^{125}\text{I}-\text{因子 VIIIa/VIIIa}$ の特異的結合を定量することにより試験した。

J82 細胞を 12 穴培養プレート中、フェア (Fair) 等によって報告されているように (上述)、集密度するまで培養し、バッファ A ($1.37 \text{ mM Na}_2\text{C}_6\text{E}_4$ 、 4 mM KC_4 、 1.1 mM L-グルコース 、 5 mM アジ化ナトリウム 、 1.0 mM ヘペス 、pH 7.4 5) で洗浄し、ついで、精製した M. Ab 1 μg 又は、ハイブリドーマ培養上清 10 倍希釈物を含むバッファ A 0.7 μl とともに、37 ℃ で 2 時間インキュベートした。塩化カルシウム及び、 $^{125}\text{I}-\text{因子 VIIIa/VIIIa}$ を各々、最終濃度 5 mM 及び 1 nM となるよう添加し、さらに 37 ℃ で 2 時間インキュベートした。その後、細胞表面を、冷バッファ B ($1.40 \text{ mM Na}_2\text{C}_6\text{E}_4$ 、 0.5 mM BSA 、 5 mM Tris HCl 、pH 7.4 5) で 5 回洗浄し、1 mL の 0.2 M Na_2OH 、1% SDS、1.0 mM EDTA 液液中で溶解し、その溶解物のガムマ線をカウントした。特異的結合は (非ラベル因子 VIIIa/VIIIa を 100 倍過剰存在下、細胞と会合する $^{125}\text{I}-\text{因子 VIIIa/VIIIa}$)、非特異的結合放射活性を差し引いて測定した。特異的結合の阻害率は 9 容のバッファ A と、1 容の培養培地で処理したコントロール細胞に対する、M. Ab で処理した J82 細胞という形で測定した。

因子 VIIIa/VIIIa が TF に結合したとき、それはうまく取り込まれないが、抗体結合による TF インターナリゼーションの可能性を除くため、J82 細胞を、5 mM アジ化ナトリウムで代謝的に毒殺した。細胞のアジド処理の有無にかかわらず同じ結果が得られ

平成 7.12.20 発行

複合体の形成を阻害する能力を研究した。

TBS 中、 $100 \mu M$ の huTF ポリペプチド類似物を含む溶液 $50 \mu L$ を、96穴平底ポリスチレン検定プレートの各ウェル 96 個に入れ、ついでその各ウェルに、例 3 で述べたように準備した、TBS 中 $1 \mu M$ の濃度に調整した因子VII/VIIIa を含む溶液 $25 \mu L$ を加え、さらに、TBS 中 2mM の氯化カルシウム $25 \mu L$ を加え、その混合物を 30 分間室温に維持した。

ヒト臍膜がん細胞 J 82 細胞を、アメリカン・タイプ・カルチャーコレクション (ATCC HTB 1; MD 州、ロックビル) から入手し、参考としてここに組込まれているフェア (Fair) 等の方法 (ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー)、262巻、11692-11698頁 (1987年) に従って培養した。

$50 \mu L$ の TBS に 5×10^4 個の J 82 細胞を懸濁し、上述の維持を行った後、ポリスチレン検定プレートの各ウェルに入れた。その後、ただちに、フェア (Fair) 等の報告のように (上述) 準備した、TBS 中 $100 \mu M$ の濃度の因子X $25 \mu M$ 及び、Xa 発色基質 S-2222 (1mM / mL TBS) $50 \mu L$ を加え混和し、その混合物を 2 分間室温に維持して、発色反応物を含む溶液とした。

生成した発色反応量を、V-max 96穴スペクトロボトメーター (カリネルニア、マウンテン・ビュー、モレキュラー・デバイス社) を用い、 405nm での光学密度 (O.D.) を測定して定量した。ポリペプチドの代りに TBS を用いるか、又は、因子VII無添加のコントロールも測定し最高及び最低 O.D. 値を決定した。これら阻害の測定結果を第 10 表に示す。

の処理に対する阻害曲線は、因子 Xa 形成速度が、因子VIIa結合を阻害したものと同様の抗体速度で阻害されることを示している (第 17 図)。非阻害的 (非中和性) MoAb TF9-10H1'0 は ITC 温度 $10 \mu g / mL$ まで、凝血促進活性、因子VII/VIIIa 結合又は因子 Xa 生成速度にはほとんど影響を与えないし、また、コントロール MoAb PAb 100 は全く効果がない (データ示さず)。

23. huTF ポリペプチドの因子VII/VIIIaへの競合的結合による、J 82 細胞上の因子 Xa 活性化の阻害

当分野ではよく知られているように、凝血促進プロテアーゼカスケードの細胞活性化は、消費性血栓出血症と呼ばれる種々の病気と関連している。一例に、凝血促進プロテアーゼカスケードは、膜レセプター及び基本的共因子、組織因子 (TF) に対する因子VII/VIIIa の高い親和性による発見により、細胞表面で開始する。TF 及び因子VII/VIIIa の二分子凝血促進複合体 (TF : VII/VIIIa) は、最終的にトロンビン形成及びフィブリンの析出につながる限定したタンパク質分解による因子 Xa 及び IXa の活性化を起こす。さらに、凝血における TF の役割、TF による凝集プロテアーゼカスケードの開始は、凝血性血管内凝固及びトロンボグロブリンと関連する。ニーメツ (Niemets) 等、ブラッフ (Blood) 42巻、47頁 (1973年) 及びベビラクア (Bevilacqua) 等、ジャーナル・オブ・エクスペリメンタル・メディシン (J. Exp. Med.)、160巻、618頁 (1984年)。TF は、炎症性仲介物に対する応答及び細胞免疫応答で、单球及び内皮細胞の表面で発現する重要なエフェクター分子である。

本発明の huTF ポリペプチドが、因子VII/VIIIa に結合し、それにより、因子 Xa を活性化することができる、TF : VII/VIIIa

第 10 表
huTF ポリペプチドを用いた J 82 細胞に関する Xa 活性化の阻害

huTF ポリペプチド	光学密度
PBS	0.960 ± 0.083
因子VII/VIIIa なし	0.005 ± 0.001
p 1-18	1.007 ± 0.087
p 1-30	1.098 ± 0.028
p 11-28	0.687 ± 0.071
p 24-35	0.477 ± 0.017
p 26-49	0.437 ± 0.020
p 40-71	0.814 ± 0.053
p 72-104	0.781 ± 0.047
p 94-123	0.818 ± 0.055
p 121-155	0.889 ± 0.067
p 144-159	0.507 ± 0.053
p 146-167	0.004 ± 0.001
p 157-169	0.389 ± 0.035
p 161-190	0.600 ± 0.023
p 190-209	0.625 ± 0.031
p 204-226	0.715 ± 0.042
p 244-263	0.619 ± 0.047

1. もし、光学密度 (O. D.) が約 0.500 以下なら、因子 Xa の活性化の阻害は有意味であると考えた。

本研究の結果は、huTF ポリペプチド p 24-35, p 26-49, p 144-159, p 146-167 及び p 157-169 は、因子VII/VIIIa に結合し、因子 Xa を活性化できる、TF : VII/VIIIa 複合体の形成を阻害することを示している。これらの

結果は、本発明の huTF 組合部位ポリペプチド類似物が凝集を阻害するのに用いることができるることを示している。

24. 抗 huTF MoAb による凝集の生体内での阻害

しばしば、グラム陰性細菌による感染症は、最終的に死に至らしめるショック状態を起こす。このヘモスタチスシステムの乱れは、このショック状態の展開と密接に関係している。ティラー (Taylor) 等 (ジャーナル・オブ・クリニカル・インベスチゲーション (J. Clin. Invest.) 79巻、918~925頁 (1987年)) は、外的に加えられた活性化した、タノバク質 C、天然の抗凝血酵素、は、凝集応答及びヒトにおける LD₅₀ の大腸菌濃度の致命的効果を妨害する。

本発明の抗凝血 MoAb の生体内における凝集阻害能力を、ティラー (Taylor) 等 (上述) によって報じられた致死ショックのヒトモデルを用いて試験してみた。重さを計った 7~8 のヒトを実験前一晩絶食し、実験の朝、ケタミン (筋肉注射、 $1.4 \text{mg} / \text{kg}$) で先駆化した。ついで、ペントバルビタール酸ナトリウムを、経皮カテーテルを通して、頭の静脈に投与し、軽いレベルの外科的麻酔状態に維持した (約 4.5 分毎 $2 \text{mL} / \text{kg}$)。大脳部静脈を無菌的に露出させ、血液採取の為 1 方の後足にカニュールを差込んだ。経皮カテーテルは大脳部及び例 2 で示した、MoAb TF9-5B7 を含む試剤を与え、ヒトの TF と交差反応させるのに用了した。30 分間の平衡化時間の後、この動物に約 10 分間にわたって、MoAb TF9-5B7 $500 \mu g / kg$ 又は $15 \mu g / kg$ (例 7 で述べたように準備し、ついで無菌生理食塩水に透析し、 $0.58 \mu g / mL$ の濃度としたもの) 又は、無関係の MoAb $500 \mu g / kg$ を与えた。

MoAb 投与及び 30 分間の平衡化の後、各動物は、LD₅₀。

平成 7.12.20 発行

の大腸菌の投与を受けた（約10¹⁰個、投与後約8～16時間で敗血性ショックのため死をもたらす量である）。大腸菌は2時間に渡り注入により投与した。この研究結果を第11表に示す。

第11表

ヒビの敗血性ショックによる致死の生体内における阻止

グループ	MoAb μg/kg	投与 時間	大腸菌 注入量	死
I. コントロール	TF9-5B7	500	Normal	No
II. コントロール	BB ²	500	Normal	Yes
III. 實験	TF9-5B7	500	Normal	Yes
	TF9-5B7	150	Normal	Yes

1. 血圧、脳血管活性化及びフィブリリン分解産物を含む種々のヘモスタチスパラメータは、MoAb 投与後、大腸菌注入前に測定した。

2. Hbは、TP9-5B7と同じ頃及び並列のMoAbであるが、無関係の抗原と免疫反応を起こす。

第11表にみられるおり、MoAb TP9-5B7を受けたヒビはLD₅₀の大腸菌の投与に対しても生存しつづけた。MoAb 150 μg/kg及び500 μg/kgの両投与で保護された。さらに、コアグロブラーと関係する、頭著な低血圧、脳血管カスケード活性化およびフィブリリンの分解は、MoAb TP9-5B7を受けた動物で著しく緩和された。

25. ヘモグロビン・アルファ鎖としての、5.8kDa huTFヘテロダイマー経験の特徴

免疫既知性と非既知性TFをさらにウェスタンプロット分析で特性を調べ、5.8kDa huTFヘテロダイマーの成分、すなわち、例4で述べた4.7kDa 及び1.2.5kDa タンパク質を同定した。

なるという結論を支持している。

従って、現在、例4で述べられている5.8kDaヘテロダイマーの1.2.5kDa 組成成分は、ヘモグロビンのアルファ鎖であり、4.7kDa huTFタンパク質との合会は、huTF単離操作のアーティファクトであると考えられている。

例1～25の結果のまとめと討論

2つの異なる細胞融合体由来の、ヒト胎TFに対する、24種のMoAbライブラリーについて報じられている。各MoAbの免疫特異性は、ドットプロット、ウェスタンプロット及びラジオイムノアッセイにより検出された。ほとんどのMoAbは、全ての3条件下、ヒトの本来のTF及び変性TFと反応した。MoAbの1つ、TP8-5G9は、TFタンパク質のルーチンな精製にうまく使用することができる。それは粗粗抽出物由来のTF活性を吸着し、ミリグラム量の精製ヒトTFを一定して与える。

MoAbの1つ以外の全ては、精製したヒト胎TFの凝集活性を強く中和する。いくつものMoAbは、ヒビ及びサルのTFと交差反応をすることが分っているが、相同的因子VIIの存在下、ラット、ウサギ、子ウサギ、イス、牛、又はブタのトロンボプラスチンにより開始した因子VII欠損ヒト血漿の凝集を、どの抗体も阻害しなかった。さらに、ウサギトロンボプラスチンによる正常なヒト血漿の凝集開始は、どの抗体によっても阻害を受けず、このことは、ヒトTF凝集活性の阻害は、因子VII/VIIIを含む、可溶性血浆凝集タンパク質への抗体の妨害によるものではないという結論を支持する。

抗TFによるTF凝集活性の阻害に対する最も明解な原因是、因子VII/VIII結合のブロックである。予想されるとおり、全部で述べたように行った、ウェスタンプロット分析を、電気泳動するサンプルとして、例9で述べたように調製した、免疫既知性により单離したhuTF、精製したヒトヘモグロビン、又は、分子量標準を用いて行った。指示されているところではジスルフィド結合の還元のため、サンプルバッファの中に50 mMジオクタエートールを含めた。ウェスタンプロットを、非免疫化ウサギIgG、従来の方法で調製したウサギ抗huTF IgG又は、ダコ（Dako）（カリホルニア、サンタバーバラ）社から入手したウサギ抗ヒトヘモグロビンIgGを用いて、示されているように免疫反応した。最初の2つのIgG調製物は、例7で述べたように单離したMAPS-IIである。

上で述べたウェスタンプロット分析の結果は、第18図に示した。抗huTF IgGは、還元型huTFの4.7kDaのバンドとのみ免疫反応を起こし、1.2.5kDaのバンドとは反応しなかったが（バネルA、レーン3）、一方、同IgGは、非還元型huTFの5.8 kDa 及び4.7 kDa の両バンドと免疫反応を起こした（バネルA、レーン4）。これらの結果は、5.8kDaヘテロダイマーの4.7kDa 成分としてのhuTFの同定と一致している。抗ヘモグロビンIgGは、非還元型huTFサンプル中の5.8kDa バンドとのみ免疫反応を起こし、4.7kDa のモノマーとは反応しなかった（バネルB、レーン4）。しかし、抗ヘモグロビンIgGは、還元型のhuTFサンプル中の1.2.5kDa バンドと免疫反応し（バネルB、レーン3）また、1.2.5kDaの精製したヒトヘモグロビン・タンパク質と免疫反応した（バネルB、レーン2）。非免疫ウサギIgGとの反応はなかった。

上記の結果は、非還元型huTFの5.8kDa の分子は、ジスルフィド結合でヘモグロビンと結合した4.7kDa huTFから

23個の抗凝血（中和性）MoAbは、TFの基本的レセプター機能と一致して、J82細胞への因子VII/VIIIの特異的結合を妨ぐ。さらに、このことは、因子VII結合及び、因子X形成速度の阻害のハーフ・マキシマルが同じIgG濃度のときに起こる、選択した精製MoAbの投与滴定においても実証される。

ヒトTFに対するMoAbは、最近、カーソン（Carson）等（プラッド（Blood）、70巻、490頁（1987年））により、これを直接試験したのではないが、因子VII/VIII結合の妨害によることは明白に、TF活性を阻害するものであると報じられた。24個のここで述べられているMoAbのうちの23個が、TF活性を強く中和するという知見は注目に値する。他のヒト胎TFタンパク質に対するMoAbを用いた当出版者の研究室で行った実験は、少數の割合のものが機能活性を中和するというものである。基本的TFとの交差反応性が合む、反応性が各々異なることから、ハイブリドーマ全てが兄弟クローンであるとは思えない。さらに、進行中のエピトープマッピング研究は、この種のMoAbに少なくとも3つの別々の非競合抗体結合部位が確認されることを示している。それゆえ、TFに対するMoAbを中和する大部分のものは、標的にも関係するわずかな免疫的に優れたエピトープによるものでもないらしい；事実、ホップ（Hopp）等により（モレキュラー・イムノロジー（Mol. Immunol.）20巻、483頁（1983年））TFのアミノ酸配列は、多くの抗原決定基を含んでいることが報告されている。

小さいサイズのTFは、なぜ、そんなに多くの抗TF MoAbが因子VII/VIII結合をブロックするのかを部分的に説明している。TFは、cDNAクローニングにより、グルコシル化を除いて、2.5kDaの細胞外ドメインをもつことが予想されている。それ

平成 7.12.20 発行

ゆえ抗体及び因子M/M₁分子は、より小さいTFの細胞外ドメインへの結合に立体障害を示すことになる。この立体障害仮説は、TF上の炭化水素鎖がおそらく機能には必要ないことから（ナカムラ（Nakamura）、トロンボヘモスクチス（Tron, Benost.）58巻、135頁（1987年））、コンカナバーノAはTF活性を阻害する（ピトリック（Pitlick）ジャーナル・オブ・クリニカル・インベステゲーション（J. Clin. Invest.）55巻、175頁（1975年））という観察と一致する。

それは、種々の細胞及び組織により発現した因子M依存性凝血活性は、同様の機能をもつ、1つ以上の分子種に寄因するということに、いくらか関連している。しかし、M₁Ab TF-5G9は粗脳及び胎盤抽出物及び溶解した微小芽細胞、肺がん細胞及び末梢单核細胞の凝血活性を定量的に阻害する。完全ではないが、これらの結果は、現にTFに寄因する細胞性凝血活性は、同一ではないともも抗原的に関連しているという結論を支持している。このことは、TFに対する第一の遺伝子がおそらく存在しているという知見と一致している。

最近、敗血性ショックの致死効果は、凝血プロテアーゼ CASCADEにおいて、中間段階での役割を果している抗凝血タンパク質、活性化したタンパク質Cを注入することにより、ヒトにおいて防ぐことができる事が示されている。本研究は、TF活性を阻害するM₁Abは、凝血プロテアーゼ CASCADEの開始のブロックにより、それらが、血管内凝血の病理学的活性化と通常関連している、血栓凝血因子の摂取を妨ぐので、生体内で、非常に特異性の高い抗凝血剤であることを示している。

例4で述べた58kDa型のAb TFは47kDaのTFタンパク質と、現在では免疫化学的にまだ部分的アミノ酸配列により、

抗TF抗体との反応で観察された。58kDaバンドの一部を含む、これらマイナーな分子種は、TFと他の未同定タンパク質間で形成された、混合ジスルフィド結合物を示している。

特別の様子及び例を含む先の明細は、本発明の説明を意图したものであり、これを限定するものではない。多くの他の変化や、修正が、本発明の精神や範囲を逸脱することなく行うことができる。

ヘモグロビンのアルファ鎖と同定されている、およそ12.5kDaのポリペプチドの、ジスルフィド結合で結合しているヘテロダイマーであることが示されている。58kDaのヘテロダイマーが、早朝の途中で形成されているらしいので、58kDaのバンドは、天然の細胞性TFのヘテロダイマー型であるという以前の推察は誤りであるだろう。

ヘモグロビンのアルファ鎖は、1つのシステインをもち、またTFは、cDNAから、その細胞質ドメインに1つのシステインを有することが予想される。またTFは、細胞外ドメインには4個のシステインをもつが、TF機能が還元により失なわれることから、少なくとも2つが鎖内ジスルフィド結合に使われているはずである。TFの細胞質ドメイン中の1つのシステインは、ほとんどの細胞質グルタミン酸中のシステインのように、還元型で維持されているだろう。この（TFの他のシステインは、あるいはもうない）システインは、細胞質解離後、混合ジスルフィド形成のため容易にアクセスでき、そして、単離操作間での酸化で、TFの細胞質及びヘモグロビンのシステイン間でジスルフィド結合が形成すると推測される。この結論は、ヘテロダイマー形成は、明らかに時間依存性があり、脛アセトン粉末由来のTFの界面活性剤抽出と、免疫親和性マトリックスへの結合との間の時間を小さくすることが、得られるヘテロダイマーTF量を減少させる要因を支持する。推定される96kDaのTFダイマーも、早朝の際同様のメカニズムで形成するであろう。

抗ヘモグロビン抗体カラムは、3つの58kDaのヘテロダイマーを特異的に結合したが、免疫親和性で精製したTF開型物中に検出できる高分子量種全てを定量的に除くことはなかった。47kDa以上の分子量をもつ他の微量のマイナーバンドは、

請求の範囲

- (1) ヒトの経緯因子重複タンパク質をコードする構造遺伝子を限定する配列を含む、わずか約12,000スクレオチド塩基対を含むDNA断片。
- (2) 上記構造遺伝子が、第1図の約1番から約263番の残基で表わされるアミノ酸残基配列を有するタンパク質をコードする、請求の範囲(1)記載のDNA断片。
- (3) 上記構造遺伝子が、第2図の、約130番から約918番の残基で表わされるスクレオチド塩基配列を有する、請求の範囲(2)記載のDNA断片。
- (4) 上記構造遺伝子が、第1図の約1番から約219番の残基で表わされるアミノ酸残基配列を有する可溶性ヒト経緯因子重複タンパク質をコードする、請求の範囲(1)記載のDNA断片。
- (5) 上記構造遺伝子が、第2図の、約130番から約786番の残基で表わされるスクレオチド塩基配列を有する、請求の範囲(4)記載のDNA断片。
- (6) 上記第1の配列の5'末端に連続し、かつ上記タンパク質のアミノ末端に結合した、アミノ酸残基配列をコードする第2の配列も含み、かつ第1及び第2のDNA配列がヒト経緯因子重複タンパク質をコードする混成構造遺伝子を定義する、請求の範囲(1)記載のDNA断片。
- (7) 上記混成構造遺伝子が、第1図の約1番から約263番の残基で表わされるアミノ酸残基配列を有するタンパク質をコードする、請求の範囲(5)記載のDNA断片。
- (8) 上記混成構造遺伝子が、第2図の約34番から約918番の残基で表わされるスクレオチド塩基配列を有する、請求の範囲(7)記載のDNA断片。

平成 7.12.20 発行

- (9) 上記混成構造遺伝子が、第1図の約-32番から約219番の残基で表わされるアミノ酸残基配列を有する、可溶性ヒト組織因子重複タンパク質前駆体をコードする、請求の範囲(6)記載のDNA断片。
- (10) 上記混成構造遺伝子が、第2図の約34番から約786番の残基で表わされるスクレオチド残基配列を有する、請求の範囲(9)記載のDNA断片。
- (11) ヒト組織因子重複タンパク質をコードする構造遺伝子を定義する第1のDNA断片に標識的に結合したベクターを含む組換えDNA分子。
- (12) 上記構造遺伝子が、第1図の約1番から約263番の残基で表わされるアミノ酸残基配列を有するタンパク質をコードする、請求の範囲(1)記載の組換えDNA分子。
- (13) 上記構造遺伝子が、第2図の約130番から約918番の残基で表わされるスクレオチド残基配列を有する、請求の範囲(11)記載の組換えDNA分子。
- (14) さらに、上記第1の断片の5'末端に連結し、かつ上記タンパク質に結合した、アミノ酸残基リーダー配列をコードし、かつ該第1及び第2のDNA断片が、上記タンパク質の前駆体をコードする混成構造遺伝子を定義する、請求の範囲(1)記載の組換えDNA分子。
- (15) 上記混成構造遺伝子が、第1図の約-32番から約263番の残基で表わされるアミノ酸残基配列に対応するアミノ酸残基配列を有する、上記タンパク質の前駆体をコードする、請求の範囲(11)記載の組換えDNA分子。
- (16) 上記混成構造遺伝子が、第2図の約34番から約918番の残基で表わされるスクレオチド残基配列に対応するスクレオチド

(25)

```

H-SGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTIILEWEPKPV-OH,
H-TKSGDWNSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQTY-OH,
H-KSGDWNSK-C-OH,
H-ECDLTDEIVXDVVKQTY-OH,
H-LARVFTSYPAGNVESTCGSAGEPLYENSPFPTPYLC-OH,
H-YENSPFPTPYLETHLQGQPTIGSFHQVGCTKV-OH, RU
H-QAVIPSRITVNRKSTDSPVEC-OH.

```

からなる群から選ばれた式で表わされるヒト組織因子結合部位ポリペプチド類似物。

(26)a) ヒト組織因子重複タンパク質と免疫反応し、

b)

```

H-ZPKPVNQVTVQISTKSGDWNSK-C-OH,
H-VFGKDLIYTLYWKSNSSGKKT-OH,
H-SSSGKKTAKINTNEFLIDVDKGENVCFSV-OH,
H-SGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTIILEWEPKPV-OH,
H-TKSGDWNSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQTY-OH,
H-KSGDWNSK-C-OH,
H-ECDLTDEIVXDVVKQTY-OH,
H-LARVFTSYPAGNVESTCGSAGEPLYENSPFPTPYLC-OH,
H-YENSPFPTPYLETHLQGQPTIGSFHQVGCTKV-OH, RU
H-QAVIPSRITVNRKSTDSPVEC-OH; RU

```

からなる群から選ばれた式で表わされるポリペプチドと免疫反応し、かつ

c) 第1図の第204番から第226番の部位で示される式で表わされるポリペプチドと実質的に免疫反応しない、抗体分子を含む、抗体組成物。

(27) 上記抗体がラベルに結合している、請求の範囲(26)記載の組成物。

下記配列を有する、請求の範囲(15)記載の組換えDNA分子。
(17) 上記ベクターが上記第1及び第2のDNA断片の複数を複数し、請求の範囲(11)記載の組換えDNA分子。

(18) 上記ベクターが、宿主細胞中、上記タンパク質を発現し、請求の範囲(11)記載の組換えDNA分子。

(19) 上記ベクターが、宿主細胞中、上記タンパク質を発現し、請求の範囲(14)記載の組換えDNA分子。

(20) 上記ベクターが、pKSV-10であり、かつ、上記混成構造遺伝子が、可溶型の上記前駆体タンパク質をコードし、かつ、第2図の34番から786番の残基で表わされるスクレオチド配列を有する、請求の範囲(19)記載の組換えDNA分子。

(21) わずか約50アミノ酸残基を含み、かつ、

-VNNVVTVVIST-, 及び

-LIVWKKSSSSGKKT-

からなる群から選ばれた式で表わされる配列に対応するアミノ酸残基を含む、ヒト組織因子結合部位ペプチド類似物。

(22) 上記ポリペプチドが、式:

H-VNNVVTVVIST-OH

で表わされる、請求の範囲(21)記載のポリペプチド。

(23) 上記ポリペプチドが、式:

H-LIVWKKSSSSGKKT-OH

で表わされる、請求の範囲(21)記載のポリペプチド。

(24)

```

H-EPKPVNQVTVQISTKSGDWNSK-C-OH,
H-VFGKDLIYTLYWKSNSSGKKT-OH, RU
H-SSSGKKTAKINTNEFLIDVDKGENVCFSV-OH.

```

からなる群から選ばれた式で表わされるヒト組織因子結合部位ポリペプチド類似物。

(28) 上記抗体が、生理学的に許容しうる浴剤中に存在する、請求の範囲(26)記載の抗体組成物。

(29) ヒト組織因子重複タンパク質及び第1図の26番から49番の残基で示される式で表わされるポリペプチドと免疫反応する抗体分子を産生する、TF8-5G9と命名されたハイブリドーマ。

(30) 請求の範囲(29)記載のハイブリドーマにより産生される抗体分子を含むモノクローナル抗体組成物。

(31) ヒト組織因子重複タンパク質及び、第1図の第26番から第49番の残基で示される式で表わされるポリペプチドと免疫反応する抗体分子を産生する、TF9-10H10と命名された、ハイブリドーマ。

(32) 請求の範囲(31)記載のハイブリドーマにより産生される抗体分子を含むモノクローナル抗体組成物。

(33) ヒト組織因子重複及び、第1図の第146番から第167番で示される式で表わされるポリペプチドと免疫反応する抗体分子を産生する、TF9-6B4と命名した、ハイブリドーマ。

(34) 請求の範囲(33)記載のハイブリドーマにより産生される抗体分子を含むモノクローナル抗体組成物。

(35)a) 体サンプルを、ヒト組織因子重複タンパク質と混合し、免疫反応混合物を作る;

b) この混合物を、上記抗体がサンプル中に存在するヒト組織因子と免疫反応し、免疫反応物を形成するのに十分な時間保持する、そして、

c) ステップb)で生成した免疫反応物の存在を検定する。以上、a)～c)のステップを含む、体サンプル中のヒト組織因子重複タンパク質の存在を検定する方法。

平成 7.12.20 発行

を含むサンプル中に存在するヒト組織因子重複タンパク質の存在を検定するための、キットの形をした診断システム。

- (35) a) 生理学的に許容じうる免疫剤及び、血栓中に存在するヒト
組織因子と効率よく免疫反応する、生体内指示手段と結合
した、ハイブリドーマ TF 9-10H10 によって產生さ
れる、ある量の抗体分子を含むモノクローナル抗体組成物
を被検者に静脈投与する。

b) 上記投与を受けた被検者を、上記抗体分子が、血栓の一部
として生体内に存在する組織因子と免疫反応し、免疫反応
産物を形成するのに十分な、予め決められた時間維持する
そして、

c) ステップ b) で生成した免疫反応産物の存在を検定する。
以上、a) ~ c) のステップを含む生体内の血栓を検出する方
法。

(37) 存在するセト組織因子と効率よく結合する、TF 8-5G9
及び TF 9-6B1 からなる群から選らんだハイブリドーマに
よって產生される、ある量の抗体分子を含有する生理学的に許
容される免疫剤を含む、モノクローナル抗体組成物を、被検体
に静脈投与することを含む、生体内におけるヒト組織因子の凝
血因子Ⅷ/Ⅸへの結合能を中和する方法。

(38) 組成物中、因子Ⅷ/Ⅸと効率的に結合する量の、

H-EYKPVNQVTVQIISTKSGDWIKSXC-OH,
 H-VYGKOLIYTLYWPKSSSGCKKT-OH, *Bif*
 H-SSSGKRTAXTHTHEFLIDV/DKGENYC7SV-OH.

からなる群から選ばれたポリペプチドを、含有する生理学的に許容された希釈剤を含むポリペプチド組成物を被投与者に静脈投与することを含む、生体内におけるヒト組織因子の凝血因子Ⅹ／Ⅸへの結合を阻害する方法。

(39) a) 請求の範囲(22)記載の抗体組成物を含有するパッケージ

求の範囲(42)記載の組成物。

- (46) a) 少なくとも1回の検定を行うのに十分な量の、実質的にヒト組織因子遺伝タンパク質を含まない、生物学的活性のあるヒト組織因子遺伝タンパク質の水溶液を含有する組成物を含むパッケージ。

を含む血管システム液体サンプル中の凝固能を検定するキットの形をした診断システム。

(47) 上記遺伝タンパク質がリン脂質中に分散している、請求の範囲(46)記載の診断システム。

(48) 上記タンパク質が可溶性であり、かつ、第1図の第1番から第219番の部位で変わられるアミノ酸残基配列を有する、請求の範囲(46)記載の診断システム。

(49) a) トトロポ因子遺伝タンパク質をコードする構造遺伝子を定位する第1のDNA断片及び、第1のDNA断片と連続しており、かつ上記タンパク質に結合する、アミノ酸残基配列をコードする第2のDNA断片で、構築第1及び第2のDNA断片合せて上記タンパク質の前駆体をコードする成熟構造遺伝子を定位しているDNA断片と異常に結合する、ホ乳頭細胞に適合する発現ベクターを含む組換えDNA分子でトランスフォームしたホ乳頭細胞の栄養培地での培養を開始する；

b) 上記培養物を上記細胞が上記組換えDNA分子由来のタンパク質を発現し、かつ、上記成熟タンパク質を形成するのに十分な時間、維持する。そして

c) 上記培養物から、上記成熟タンパク質を回収する。

以上、a)～c) のステップを含む、成熟ヒト組織因子遺伝タンパク質の調製方法。

- (49) 上記モノクローナル抗体分子を含む上記抗体成物が、

- a) TF 8 - 5 G 9.
 - b) TF 9 - 6 B 4.
 - c) TF 9 - 10 H 10

からなる群から選ばれたハイブリドーマにより産生される、請求の範囲(39)記載の診断システム。

- (41-a) サンプルを、固体マトリックスに固定した、請求の範囲

- (15) 記載のポリペプチドを含む固体サポートと混合し、結合反応混合物とする。

→ 上記結合反応混合物を、上記凝血因子が上記ポリペプチドと結合し、固相複合体及び上清を形成するのに十分な時間維持する。

→ 上記複合体から上記上清を分離する、及び

→ (1) ステップ c) の分離した複合体から、上記凝血因子を回収する。

以上、 α ~ δ のステップを含む、サンプルから血液凝固因子VII/VIIIを単離する方法。

- (42) 実質的に、ヒト組織因子凝集タンパク質を含まない生理学的活性のあるヒト組織因子重複タンパク質の水溶性を含む組成物。

- (43) 上記生物学的活性のあるヒト組織因子遺傳タンパク質を、リソソーム脂質中に分散させた、請求の範囲(42)記載の組成物。

- (44) 上記溶液が、非イオン性界面活性剤を含む、請求の範囲(42)記載の組成物。

- (45) 上記タンパク質が可溶性であり、かつ、第1図の第1番から第219番の部位で変わられるアミノ酸残基配列を有する、請

- (50) 上記選択培養遺伝子が、第2図の第3・4番から第7・8・6番の塩基で表わされるスクレオチド塩基配列を有する、請求の範囲 (49) 2項の方法。

- (51) 請求の範囲(49)記載の方法により產生した、成熟ヒト組織因子質抗原の基本的な性質

- (52)請求の範囲(50)記載の方法により產生した成熟ヒト組織因子
遺傳タンパク質を基本的に含む組成物

- (53) バイオブリードーマ TFB-5G9 により産生される抗体分子を、投与時間内に存在するヒト組織因子と効率よく結合できる量を有する、生理学的に許容された殺癌剤を含む、モノクローナル抗体組成物を、被検者に静脈投与することを含む、ヒト組織因子の活性抑制剤を用いた方法。

- (54) ピト組織因子重鎖タグバク質及び、第1図の第26番から第49番の残基で示される式で表わされるポリペプチドと免疫反応する抗体分子を生産する、TP9-5B7と命名されたハイ

- (55)請求の範囲(54)記載のハイブリドーマにより産生される抗体

- (56) ハイブリドーマ TFP 9-5B7 により产生される抗体分子を含有する生理学的に許容された抗原剤を含む治療に効果的な量のモノクローナル抗体組成物を、被患者に投与することを含む、ヒト組換え因子の凝血防凝結を中和する方法。

- (57) ヒト組織因子重鎖タンパク質と免疫反応し、それにより、
該タンパク質の因子Ⅴ／Ⅷへの結合能を阻害する。

- b) huTFab: W/M = 抗体複合体と免疫反応し、それにより、
抗複合体の因子X活性化能を阻害する抗体分子を含む治療
的に効果的量の、抗凝血モノクローナル抗体組成物を投与

平成 7.12.20 発行

することを含む凝血を阻害する方法。

(58) 上記抗体分子がさらに、ヒヒ粗模因子と免疫反応を起こすことを特徴とする、請求の範囲(57)記載の方法。

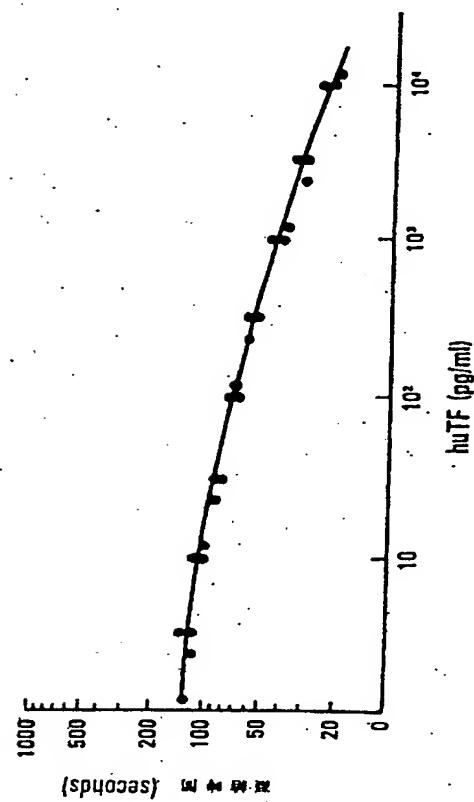


FIG. 3

リソウ質化TFペプチドによる
TF因子Wの活性化の観察

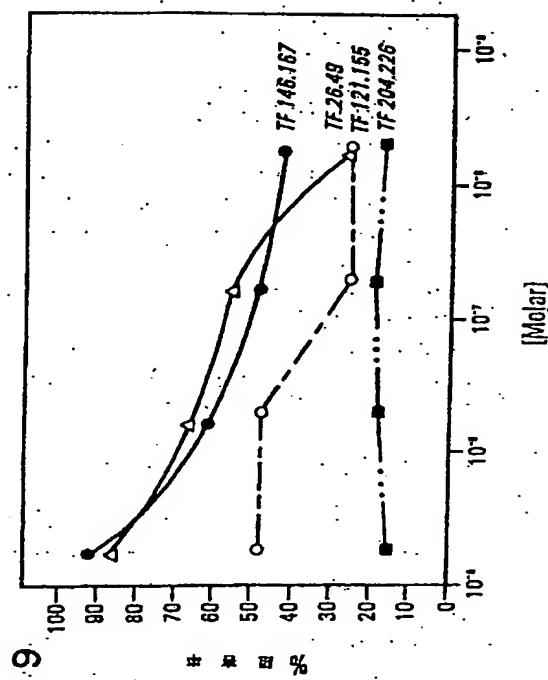


FIG. 9

リソウ質化TFペプチドによる
因子Wの活性化の観察

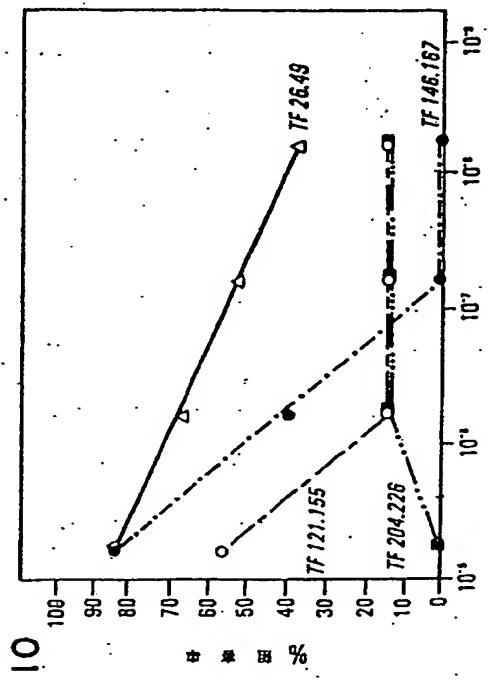


FIG. 10

平成 7.12.20 発行

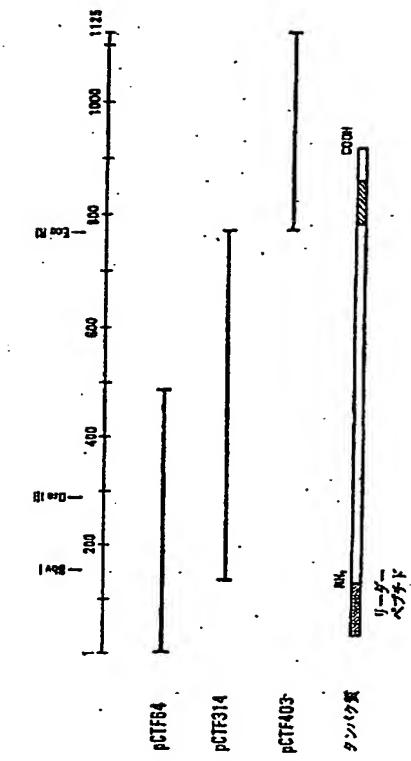


FIG. 11

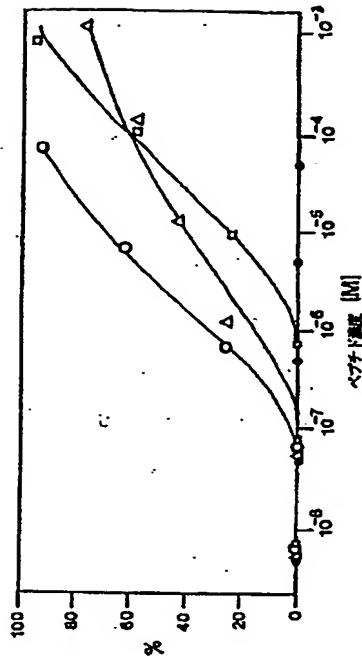


FIG. 12

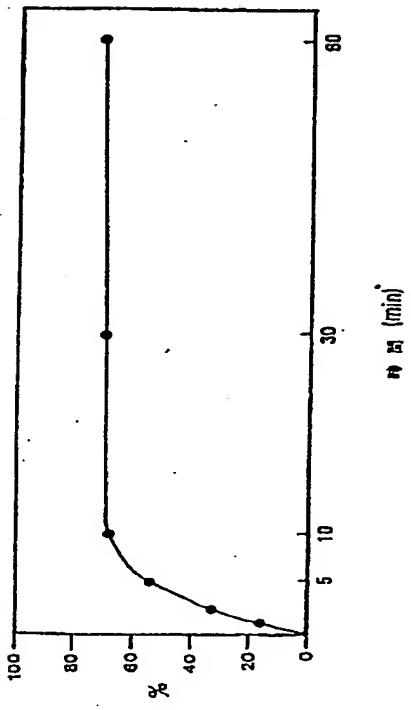


FIG. 13

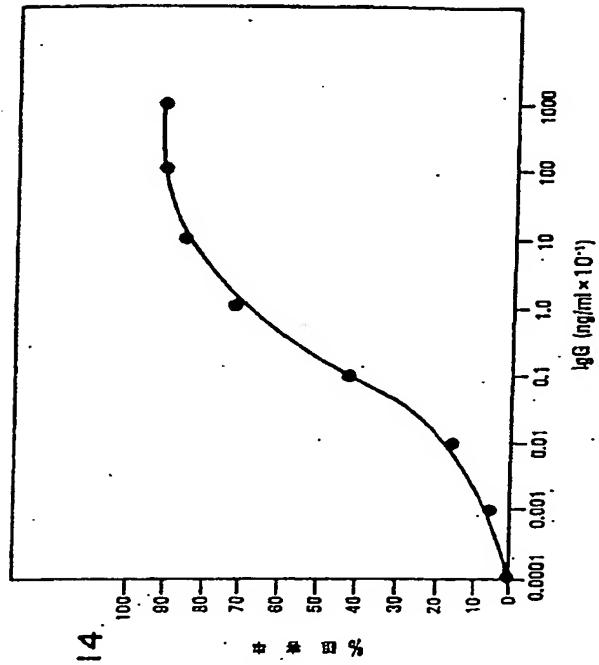


FIG. 14

平成 7.12.20 発行

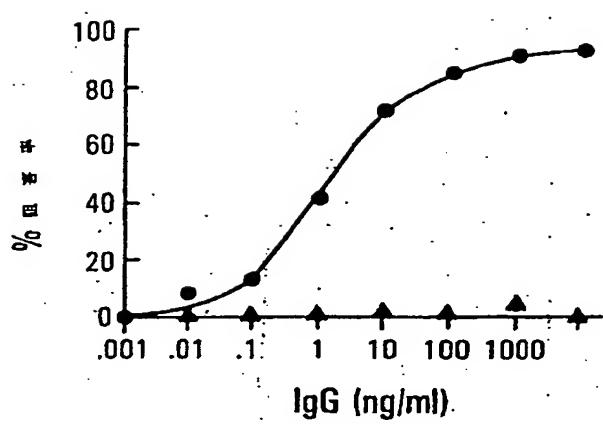


FIG. 16

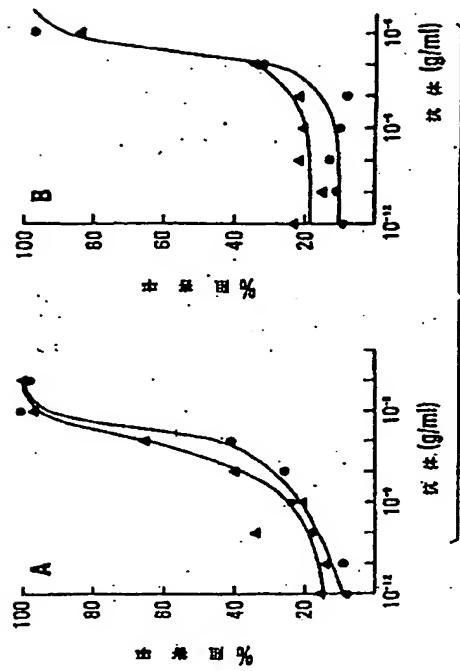


FIG. 17

This Page Blank (uspto)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

This PAGE Blank (Top)